

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIENCIAS AGRARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENETICOS VEGETAIS**

DAISY ZAMIRA DELGADO MÉNDEZ

**CARACTERIZAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE ISOLADOS
DE *Colletotrichum fructicola* EM FRUTOS DE MACIEIRA (*Malus
domestica* Borkh.) EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE
DESENVOLVIMENTO**

Florianópolis, SC
2016

DAISY ZAMIRA DELGADO MÉNDEZ

**CARACTERIZAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE ISOLADOS
DE *Colletotrichum fructicola* EM FRUTOS DE MACIEIRA (*Malus
domestica* Borkh.) EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE
DESENVOLVIMENTO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Departamento de Fitotecnia, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte para obtenção do Grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero

Co-orientador: Prof. Dr. Marciel João Stadnik

Florianópolis, SC
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

DELGADO MÉNDEZ, DAISY ZAMIRA
CARACTERIZAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE
Colletotrichum fructicola EM FRUTOS DE MACIEIRA (Malus
domestica Borkh.) EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE
DESENVOLVIMENTO. / DAISY ZAMIRA DELGADO MÉNDEZ ;
orientador, Robson Marcelo Di Piero ; coorientador,
Marciel João Stadnik. - Florianópolis, SC, 2016.
124 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Maçã. 3.
Colletotrichum fructicola. 4. Mancha foliar de Glomerella.
5. Podridão amarga. I. Di Piero, Robson Marcelo . II.
Stadnik, Marciel João . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais. IV. Título.

CARACTERIZAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE ISOLADOS DE *Colletotrichum fructicola* EM FRUTOS DE MACIEIRA (*Malus domestica* Borkh.) EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO

Por

Daisy Zamira Delgado Méndez

Tese julgada e aprovada em 27/09/2016, em sua forma final pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CC/UFSC.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero (Presidente – CCA/UFSC)

Prof. Dr. Pedro Mondino (Titular Externo- FAGRO/UDELAR)

Dr. Leonardo Araujo (Titular Externo – EPAGRI-SC)

Prof. Dr. Rosete Pescador (Titular Interno – CCA/UFSC)

Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Membro Interno – CCA/UFSC)

Dr. Everton Blainski (Membro externo – EPAGRI-SC)

Prof. Dr. Paulo Emilio Lovato (Coordenador do Programa)

Florianópolis
2016

*“O senhor é o meu pastor, nada me faltará”
Salmo 23,1*

DEDICO

A Deus pelo seu filho Jesus Cristo e pelo grande amor que se faz presente em todos os momentos da minha vida, porque por ele, para ele e com ele todas as coisas são feitas.

À minha mãe e rainha Nossa Senhora de Fátima, que tem ido sempre à minha frente abrindo os caminhos e tocando corações.

Ao orgulho da minha vida, meus pais Rodolfo e Nubia já que sem seu apoio e sua renúncia, eu não teria conseguido. Em especial à minha mãe por cuidar tão bem do meu filho enquanto esteve ausente. Vocês fizeram que eu alcançasse mais uma meta. Muito obrigada! Eu amo muito vocês “mis cielitos lindos”.

Ao meu amado esposo Carlos por seu amor, apoio e companhia nesta caminhada onde alcançamos juntos este logro. Muito obrigada meu amor

Ao meu filho Carlos Gustavo que com seu sorriso e alegria fazem minha vida muito mais feliz.

Aos meus irmãos Ingrid, Jonattan, Jessica e os meus queridos sobrinhos Santiago, Laura, Samuel e Ivan Felipe pelo carinho e alegria que me proporcionam.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina Programa por proporcionar o curso de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV) e aos professores e funcionários.

Ao Programa de Estudante Convênio de Pós-graduação (PEC-PG) pela bolsa de estudos para a realização dos estudos de doutorado.

Ao meu orientador Robson Marcelo Di Piero pela compreensão, pelo apoio, pela amizade e, sobretudo pela paciência.

Ao Professor Marciel João Stadnik, pela co-orientação.

Aos membros da banca examinadora.

Ao Iran pelo suporte técnico na estação experimental da Epagri – São Joaquim.

À EPAGRI-Ciram pelos dados meteorológicos.

Ao Laboratório LABCEV em especial à Prof^a. Zenilda e ao Dr. Eder pelo auxílio na microscopia.

Ao Laboratório LFDGV em especial ao Prof. Miguel Guerra e a Clarissa Capestrano pelo apoio no uso dos microscópios

À minha Avó Sofia pelas suas orações, às minhas tias Lupe, Marta, Magaly e ao meu tio Dennis que sempre estiveram dando-me apoio durante meus estudos. E a todos meus demais familiares.

Ao tio Jairo e a Omaira, Jairo e esposa pela ajuda no momento que mais precisei.

Ao Padre Gustavo pela sua incondicional ajuda, pela sua obediência para a vocação e pelo grande testemunho de vida. Muito obrigada.

Aos amigos Ricardo pela amizade, ajuda na revisão dos textos e pelos conselhos, a Carolas pela sua simpatia, a Tarsileine pelas muitas caronas e o jeito que sempre dava para solucionar as coisas, a Juju pelos bolos gostosos que sempre compartilhamos no laboratório, a Aline pelas

muitas ajudas e amizade e ao Argus pela ajuda e pelas viagens para São Joaquim.

A Dona Julia pela grande ajuda e dedicação

Ao Leo pela grande ajuda, Kamila e Ana Beatriz pela acolhida durante minha estadia em São Joaquim.

Aos amigos do Labfitop: Josiane, Maíra, Amanda, Leticia, Juliana, Paulo, Pedro, Giana, Bruna, Ludiana, Michelle e Yohanne. Muito obrigado a todos.

Aos amigos Jose, Fabiana, Martha, Tonhita, Paola, Camilo, Alberto, Miguel, Tulia, Yosleydi, David, Edna, Zecito, Diana, Lido, Liliana, Jenny e Oscar pela ajuda e pelos agradáveis momentos compartilhados.

Aos amigos de carona Vivian, Bruno, Marcelo Borguezan e o Professor Glicério Trichês.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A cultura da macieira (*Malus domestica* BORKH) é uma das principais da região sul do Brasil. Na região serrana do sul do Brasil, há condições climáticas ideais para o cultivo, com horas de frio necessárias durante o inverno. Porém na primavera e o verão, a cultura pode ser severamente afetada por doenças, em especial pela mancha foliar de *Glomerella* (MFG) e a podridão amarga (PA), ambas ocasionadas por espécies do gênero *Colletotrichum*. Em campo, frutos afetados pelo agente causal da MFG apresentam pequenas lesões marrons, que normalmente não evoluem para PA. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o processo infeccioso de isolados de *Colletotrichum fruticola* com diferentes níveis de agressividade provenientes de folhas e frutos, bem como as respostas de defesas bioquímicas e histológicas que os frutos apresentam durante a interação com o patógeno. Realizaram-se três experimentos a campo nas safras de 2013/2014, 2014/2015 e 2015/2016 em plantas da cultivar Gala. Realizaram-se inoculações de isolados de *C. fruticola* (MANE 41, proveniente de frutos com PA, e MANE 147, proveniente de folhas com MFG) em três estágios de desenvolvimento dos frutos (J1, J2, J3) e foi avaliada a incidência dos frutos com doença em plantas mantidas em campo experimental. Quando no ponto de maturação, parte dos frutos previamente inoculados foram colhidos e levados à câmara fria e as infecções quiescentes avaliadas na fase pós-colheita. Em experimento sob condições controladas, frutos colhidos em três estágios de desenvolvimento (J1, J2, L) foram utilizados para a avaliação de patogenicidade de quatro isolados de *C. fruticola* (MANE 34, 41, 57 e 147), para a determinação da atividade de proteínas relacionadas à patogênese e para a quantificação de compostos fenólicos totais. Ainda foi avaliada por histopatologia a interação dos isolados com os frutos. Frutos inoculados no campo com o isolado MANE 147 apresentaram pequenas lesões durante o estágio J1 (fruto verde) na safra de 2013/2014 e no estágio J1 e J3 (fruto no início da maturação) na safra 2015/2016. O isolado MANE 41 só provocou pouca doença em frutos verdes inoculados em campo. Porém, os frutos, quando levados à câmara fria, apresentaram PA quando inoculados com o isolado MANE 41 durante os três estágios de desenvolvimento, nas três safras avaliadas, e quando inoculados com o isolado MANE 147 nas safras de 2014/2015 e 2015/2016. Em contraste, frutos inoculados com o isolado MANE 147, na safra de 2013/2014, só foram observadas pequenas lesões marrons e essas não evoluíram para PA. Nas análises microscópicas foi observado que células reagiram à infecção fúngica

pela forte fluorescência devido ao acúmulo de compostos fenólicos presentes nas células epidérmicas e do mesocarpo. Em laboratório, no teste de patogenicidade de frutos de maçã nos três estágios de desenvolvimento, somente o isolado MANE 57 provocou PA em frutos com ou sem ferimento. O isolado MANE 41 somente provocou PA quando inoculado no estágio J2 (fruto intermediário) e L (fruto maduro) e com a presença ferimento. O isolado MANE 147 provocou pequenas lesões marrons durante os estágios J1 e J2 sem ferimento, e lesões restritas em frutos com ferimento. O isolado MANE 34 não provocou PA nos frutos com ou sem ferimento. A atividade das enzimas peroxidases (POX), fenilalanina-amoníase (PAL) e a concentração de compostos fenólicos totais (CFT) em frutos de maçã foram alteradas pela inoculação de isolados de *C. fructicola*. Na análise microscópica observou-se que o isolado MANE 57 colonizou as células da epiderme e mesocarpo durante os três estágios de desenvolvimento do fruto. Os isolados MANE 34, 41 e 147 ficaram quiescentes nos frutos nos estágios J1 e J2. Pode-se concluir que a campo, isolados de *C. fructicola* causam lesões nos frutos, que podem evoluir para PA no pós-colheita, independente do isolado utilizado ou do estágio de desenvolvimento no qual o fruto havia sido inoculado. Sob condições controladas, os isolados de *C. fructicola* podem causar PA com diferentes graus de agressividade nos frutos, independente do estágio de desenvolvimento e, mesmo ocorrendo a ativação de alguns mecanismos de defesa no fruto, o desenvolvimento da doença não é interrompido.

Palavras chave: Infecção a campo, Infecções quiescentes, Pós-colheita, Patogenicidade, Peroxidases, Fenilalanina amoníase, Compostos fenólicos, Histopatologia, Microscopia.

ABSTRACT

Apple tree (*Malus domestica* BORKH) is one of the main cultivations in Southern Brazil. In the mountain southern region of Brazil, the weather conditions are ideal for the crop by having the needed amount of cold hours during wintertime. However, during spring and summer seasons, apple crop can be severely affected by some diseases. Particularly by Glomerella leaf spot (GLS) and apple bitter rot (ABR), both caused by species from genus *Colletotrichum*. On field, fruits affected by GLS show little brownish spots that in general will not evolve to ABR. This study wants to evaluate the infectious process on *Colletotrichum fructicola* by using isolates taken from leaves and fruits presenting different severity degrees and evaluating biochemical and histological defense responses shown during interaction with the pathogen. Three field experiments with Gala crop plants were performed during the seasons of 2013/2014, 2014/2015 and 2015/2016. Inoculations of *Colletotrichum fructicola* isolates during three different fruit development stages (J1, J2 and J3) were done (MANE 41, from fruits with ABR, and MANE 147, from leaves with GLS), as well as the evaluation of the disease incidence on plants maintained in experimental field. In relation with maturation, part of the fruits previously inoculated were harvested and sent to a cold chamber; in aims to evaluate quiescent infections during post-harvest stage. In the microscopic analysis was observed that cells responded to the fungal infection by the strong fluorescence due to the accumulation of phenolic compounds present in epidermal and mesocarp cells. An experiment was conducted to evaluate the pathogenicity of four isolates *C. fructicola* (MANE 34, 41, 57 and 147) in fruits harvested in three different development stages (J1, J2 and L), under controlled conditions. These fruits were also used to determine the activity of proteins involved in the pathogenesis and quantifying the total phenolic compounds. In addition, histopathology and interaction of isolates and fruits were evaluated. Fruits inoculated on field with the isolate MANE 147 showed little injuries in stage J1 (unripe fruit) during the 2013/2014 season and in stages J1 and J3 (starting maturation) during 2015/2016 season. The MANE 41 isolate only provoke little disease on unripe fruits inoculated on field. However, fruits sent to cold chamber and inoculated with MANE 41 showed ABR in the three development stages and during the three seasons and also during the seasons 2014/2015 and 2015/2016 when inoculated with MANE 147. In contrast, fruits inoculated with MANE 147 during 2013/2014 season only exhibited little brownish spots and they didn't

evolve to ABR. In the lab, during the pathogenicity test only the isolate MANE 57 provoked ABR independently of the presence of injury, on fruits of the three development stages. MANE 41 only provoked ABR when inoculated during stage J2 (intermediary fruit) and L (mature fruit) and in the presence of injury. MANE 147 isolate, provoked little brownish spots during I and II stages in the absence of injury, and a wound restricted to fruits with injury. MANE 34, didn't provoke ABR either in presence or absence of injury. The activity of the enzymes peroxidases (POX) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentration of total phenolic compounds (CFT) in apple fruits were altered by the inoculation of *C. fructicola* isolates. In the microscopic analysis it was observed that the isolate MANE 57 colonized the cells of the epidermis and mesocarp during the three stages of development of the fruit. MANE 34, 41 and 147 isolates are quiescent in fruits in stages J1 and J2. We can conclude that in field isolates of *C. fructicola* can cause injuries in fruits which can evolve in ABR during the post-harvesting season, independently of the isolate used or development stage when isolate is inoculated. Under controlled conditions isolates of *C. fructicola* succeed to provoke ABR at different severity degrees in fruits disregarding the stage of development; even in presence of some defense mechanisms on fruits, the development of disease is not suspended.

Key words: Infection a field, quiescent infections, Post- Harvest, Pathogenicity, Peroxidases, Phenylalanine ammonia lyase, Phenolic compounds, Histopathology, Microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1 - Revisão de literatura

- Figura 1.1.** *Colletotrichum fructicola* provocando mancha foliar de Glomerella em folhas, com lesões marrons irregulares (A) e pequenas lesões marrons aprofundadas em frutos (B) Barra indica 1 cm.....42
- Figura 1.2.** Frutos de maçã com podridão amarga apresentando alta esporulação de coloração salmão-creme (A) e esporulação escura de *Colletotrichum fructicola* (B) Setas indicam esporulação. Barra representa 1cm.....44
- Figura 1.3.** Estratégias de colonização de diferentes espécies de *Colletotrichum*. Na intracelular hemibiotrófica, o conídio germina e forma na extremidade do tubo germinativo o apressório melanizado, o qual emite o *peg* de penetração e posteriormente a hifa primária. Após colonizar novas células epidérmicas, ocorre a formação da hifa secundária. Na colonização subcuticular intramural, o conídio germina, forma o tubo germinativo e apressório melanizado. A cutícula do hospedeiro é rompida pelo *peg* de penetração e a hifa se desenvolve subcuticularmente. Em estágios mais avançado, a hifa penetra nas células epidérmicas e do mesofilo. (Adaptado de PERFECT et al., 1999; MILES e SCHILDER, 2013).....46
- Figura 1.4.** Processo de infecção quiescente em frutos. Em frutos verdes, o conídio germina, forma o apressório e penetra através do *peg* de penetração para formar as hifas quiescentes nas células epidérmicas do fruto, permanecendo em repouso até o amadurecimento. Quando o fruto amadurece, formam-se as hifas secundárias necrotróficas que penetram as células do mesocarpo.....47
- Figura 1.5.** Modelo para a ativação de infecções quiescentes em patógenos de pós-colheita. Neste modelo se descreve o aumento da patogenicidade de *Colletotrichum* spp. pela

amonificação do tecido do hospedeiro (PL e NH_3), e as respostas de defesa nas células dos frutos pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Essa produção pode levar a uma morte celular dos tecidos necrosando-os rapidamente e facilitando o processo infeccioso dos patógenos (PL: Pectatoliase, NH_3 : Amônio, ERO: Espécies reativas de Oxigênio).....50

Capítulo 2

Figura 2.1. Frutos de maçã (*Malus domestica*) cultivar Gala inoculados no estágio J1 (Fruto verde), com o isolado MANE 147 de *Colletotrichum fructicola* apresentando várias pequenas lesões marrons (A) ou com o isolado MANE 41, com poucas pequenas lesões durante a safra 2013/2014 (B) aos 22 dias após a inoculação. Frutos maduros (C) com pequenas lesões quando inoculados em campo com o isolado MANE 147 no estágio J1 aos 101 dias após a inoculação e (D) frutos inoculados no estágio J3 (Fruto no início da maturação) aos 38 dias após a inoculação na safra de 2015/2016, apresentando (E) pequenas lesões marrons aprofundadas. (F) Fruto inoculado no estágio J1 (Fruto verde) com o isolado MANE 147 de *Colletotrichum fructicola* apresentando podridão amarga (PA) aos 14 dias após a inoculação na safra de 2015/2016. Barra indica 1cm para figura C e D. Barra indica 0,5 cm para E.....68

Figura 2.2. Precipitação (mm) e temperatura média ($^{\circ}\text{C}$) na estação experimental da Epagri, localizada no município de São Joaquim –SC. Dados diários dos anos 2013/2014 (novembro a fevereiro), 2014/2015 (novembro a fevereiro) e 2015/2016 (novembro a fevereiro). Setas indicam dias de inoculação com isolados (MANE 41 e MANE 147) de *Colletotrichum fructicola*.....69

Figura 2.3.

Micrografias de luz (A, D, G) e correspondente fluorescência (B, C, E, F, H, I) de seções transversais do tecido de frutos de maçã no estágio J1 (fruto verde). (A, B, C) Tecidos de frutos de maçã não inoculados (controle). Tecidos de frutos de maçã aos 14 dias após

a inoculação com os isolados MANE 147 (D, E, F) e MANE 41 (G, H, I). de *Colletotrichum fructicola*. (A, D, G) Algumas células reagiram à infecção fúngica pelo acúmulo de compostos fenólicos (cabeças de seta). Autofluorescência (setas) em tecidos de frutos de maçã quando utilizado filtro azul (395 a 400nm de excitação; B, E, H) e UV (365 nm excitação; C, F, I). Asterisco indicam regiões deprimidas no tecido dos frutos. Células epidérmicas (ep), cutícula (ct), grãos de amido (sg), células do mesocarpo (me), Barras 50 μ m.....73

Figura 2.4. Frutos maduros de maçã cultivar Gala com sintomas de podridão amarga após seis meses de armazenagem em câmara fria. (A e B) Frutos aos 234 dias após a inoculação com isolado MANE 41 de *Colletotrichum fructicola* durante o estágio J3. (A) Lesão aprofundada com alta esporulação no centro da podridão. (B) Parte interna do fruto com lesão em formato de V no sentido da cutícula para o centro do fruto. (C e D) Frutos aos 284 dias após a inoculação com o isolado MANE 147 durante o estagio J1, com pequenas lesões marrons (C) e podridão amarga (D). Barra representa 1 cm.....76

Capítulo 3

Figura 3.1. Diâmetro médio das lesões aos 14 dias após a inoculação com os isolados MANE 34 (a, e, i), 41 (b, f, j), 147 (c, g, k) e 57 (d, h, l) de *Colletotrichum fructicola* em frutos de maçã da cultivar Gala nos estágios J1 (fruto verde - a, b, c, d), J2 (fruto intermediário - e, f, g, h) e L (fruto maduro - i, j, k, l) . Nas letras d, f, h, j, l frutos possuem sintomas típicos de podridão amarga, enquanto que nas letras g, i, k as lesões são pequenas e restritas. Frutos sem lesão em a, b, c, e. Letras maiúsculas iguais nos estágios fenológicos para um mesmo isolado e minúsculas iguais para isolados dentro de um mesmo estagio não apresentam diferença significativa ($p \leq 0,05$) conforme determinado pelo teste de Tukey. Barra representa 1 cm. Dados transformados para $\sqrt{x+1}$96

Figura 3.2. Frutos no estágio J1 (fruto verde) de maçã da cultivar Gala, quatro dias após inoculação de isolados (A) MANE 147 e (B) 57 de *Colletotrichum fructicola* apresentando halo clorótico ao redor do local da inoculação. Barra representa 1cm.....97

Figura 3.3. Número de lesões aos 14 dias após a inoculação com isolados MANE 34 (a, e, i), MANE 41 (b, f, j), MANE 147 (c, g, k) e MANE 57 (d, h, l) de *Colletotrichum fructicola* em frutos de maçã da cultivar Gala dos estágios J1 (a, b, c, d), J2 (e, f, g, h) e L (i, j, k, l). Frutos com sintomas de podridão amarga (d, h, l), pequenas lesões (c, g) ou ausência de sintomas (a, b, e, f, i, j, k). Letras maiúsculas iguais nos estágios fenológicos para um mesmo isolado e minúsculas iguais para isolados dentro de um mesmo estágio não apresentam diferença significativa ($p \leq 0,05$) conforme determinado pelo teste de Tukey. Barra representa 1 cm.....98

Figura 3.4. Atividade de peroxidases (POX: A, B, C.), fenilalanina amônia-liases (FAL: D, E, F) e acumulação de compostos fenólicos totais (CFT: G, H, I), em frutos de maçã de diferentes estágios de desenvolvimento da cultivar Gala às 24, 48 e 72 horas após a inoculação com diferentes isolados de *Colletotrichum fructicola* (MANE 34, 41, 147, 57). Letras maiúsculas iguais nos estágios fenológicos para um mesmo isolado e minúsculas iguais para isolados dentro de um mesmo estágio não apresentam diferença significativa ($p \leq 0,05$) conforme determinado pelo teste de Tukey. Asteriscos representa diferença significativa quando comparado a frutos não inoculados (linhas pontilhadas) dentro de cada estágio de desenvolvimento dos frutos.....101

Figura 3.5. Micrografias de luz de seções transversais de epicarpo de frutos de maçã de diferentes estágios de desenvolvimento J1 (fruto verde; A, B, C), J2 (fruto intermediário; D, E, F) e L (fruto maduro; G, H, I). Nos fragmentos de frutos de distintos estágios foi observado a cutícula, seguida de pequenas células epidérmicas, com grande acúmulo de compostos fenólicos (cabeça de seta) e grãos de amido. Secções

coradas com azul de toluidina (ATO) (A, B, D, E, G, H) mostram reação metacromática de parede celular das células e polissacarídeos ácidos. Secções coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) (C, F, I) apresentam reação positiva para amido e parede celular. Células do mesocarpo de maior tamanho foram associadas com estágios de desenvolvimento mais avançados e apresentavam escassa acumulação de compostos fenólicos. Células epidérmicas (ep), cutícula (ct), grão de amido (sg), mesocarpo (me). Barras 20 µm. exceto as figuras A, D e G 50 µm.....102

Figura 3.6. Micrografias de luz de seções transversais de epicarpo de frutos de maçã no estágio J1 (fruto verde), às 24 horas após a inoculação com isolados de *Colletotrichum fructicola*. Conídios dos isolados MANE 34 (A, B), 41 (C, D) e MANE 147 (E, F) germinaram e formaram apressórios na cutícula dos frutos. Conídios do isolado MANE 57 (G, H) germinaram, formaram apressórios e hifas do fungo colonizaram massivamente (setas) as células epidérmicas e do mesocarpo. Secções coradas com azul de toluidina (ATO) (A, C, E, G) mostram reação metacromática de parede celular das células e hifas do fungo com coloração roxa, algumas das células reagiram à infecção fúngica pela acumulação de compostos fenólicos (cabeça de seta). Secções coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) (B, D, F, H) apresentam reação positiva para amido e parede celular. Apressório (ap), células epidérmicas (ep), conídio (cn), cutícula (ct), grãos de amido (sg). Barras 20 µm. Barra G. 10 µm.....104

Figura 3.7. Micrografias de luz de seções transversais de epicarpo de frutos de maçã no estágio J1 (fruto verde), às 72 horas após a inoculação com isolados de *Colletotrichum fructicola*. Conídios dos isolados MANE 34 (A, B), 41 (C, D) e MANE 147 (E, F) germinaram e formaram apressórios na cutícula dos frutos. Nas células epidérmicas dos frutos inoculados com o isolado MANE 41(C, D) foi observado algumas divisões celulares (diamante negro). Conídios do

isolado MANE 57 (G, H) germinaram, formaram apressórios e colonizaram massivamente com hifas do fungo (seta) as células epidérmicas e do mesocarpo. Algumas células epidérmicas e do mesocarpo apresentaram descolamento da membrana (H) indicando uma possível morte celular (asteriscos). Secções coradas com azul de de toluidina (ATO) (A, C, E, G) mostram reação metacromática de parede celular das células e hifas do fungo com coloração roxa, algumas das células reagiram à infecção fúngica pela acumulação de compostos fenólicos (cabeça de seta). Secções coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) (B, D, F, H) apresentam reação positiva para amido e parede celular. Apressório (ap), células epidérmicas (ep), conídio (cn), cutícula (ct), grãos de amido (sg). Barras 20 µm.....105

Figura 3.8. Micrografias de luz de secções transversais de epicarpo de frutos de maçã no estágio J1 (fruto verde) 15 dias após inoculação com o isolado MANE 57. Imagens de acérvulo de *Colletotrichum fructicola* com grande produção de conídios (cabeça de seta). Cutícula (ct), células epidérmicas (ep), mesocarpo (me), grãos de amido (sg).....106

Figura 3.9. Micrografias de luz de secções transversais de epicarpo de frutos de maçã no estágio J2 (fruto intermediário), às 24 horas após de inoculação com isolados de *Colletotrichum fructicola*. Conídios dos isolados MANE 34 (A e B) e MANE 147 (E e F) germinaram e formaram apressórios na cutícula dos frutos. Conídios dos isolados MANE 41 (C, D) e MANE 57 (G, H) germinaram, formaram apressórios e hifas do fungo colonizaram massivamente (seta) as células epidérmicas e do mesocarpo. Secções coradas azul de toluidina (ATO) (A, C, E, G) mostram reação metacromática de parede celular das células e hifas do fungo com coloração roxa, algumas das células reagiram à infecção fúngica pela acumulação de compostos fenólicos (cabeça de seta). Secções coradas com ácido periodico de Schiff (PAS) (B, D, F, H) apresentam reação positiva para amido e parede celular. Apressório (ap), células epidérmicas (ep),

conídio (cn), cutícula (ct), grãos de amido (sg). Barras
20 µm. Barra G. 10 µm.....107

Figura 3.10. Micrografias de luz de seções transversais de epicarpo de frutos de maçã no estágio J2 (fruto intermediário), às 72 horas após da inoculação com isolados de *Colletotrichum fructicola*. Conídios dos isolado MANE 34 (A, B), e MANE 147 (E, F) germinaram e formaram apressórios na cutícula dos frutos, embora raramente foi observado hifas do fungo colonizando as células epidérmicas e do mesocarpo. Em contraste, conídios dos isolados MANE 41 (C, D) e MANE 57 (G, H), germinaram, formaram apressórios e abundantes hifas do fungo (seta) colonizando células epidérmicas e do mesocarpo. Secções coradas com azul de toluidina (ATO) (A, C, E, G) mostram reação metacromática de parede celular das células e hifas do fungo com coloração roxa. Muitas células reagiram à infecção fúngica pela acumulação de compostos fenólicos (cabeça de seta) e algumas destas células apresentaram descolamento da membrana indicando uma possível morte celular (diamante negro). Secções coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) (B, D, F, H) apresentam reação positiva para amido e parede celular. Apressório (ap), células epidérmicas (ep), conídio (cn), cutícula (ct), grãos de amido (sg). Barras 20 µm.....108

Figura 3.11. Micrografias de luz de seções transversais de epicarpo de frutos de maçã no estágio L (fruto maduro), às 24 horas após de inoculação com isolados de *Colletotrichum fructicola*. Conídios dos isolado MANE 34 (A e B), MANE 41 (C e D), MANE 147(E e F) e MANE 57 (G, H) germinaram, formaram apressórios e colonizaram com hifas do fungo (seta) as células epidérmicas e do mesocarpo. Secções coradas com azul de toluidina (ATO) (A, C, E, G) mostram reação metacromática de parede celular das células e hifas do fungo com coloração roxa, algumas das células reagiram à infecção fúngica pela acumulação de compostos fenólicos (cabeça de seta) nas células da epiderme e mesocarpo. Secções coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) (B, D, F, H)

apresentam reação positiva para amido e parede celular. Apressório (ap), células epidérmicas (ep), conídio (cn), cutícula (ct). Barras 20 µm.....109

Figura 3.12. Micrografias de luz de seções transversais de epicarpo de frutos de maçã no estágio L (fruto maduro), após 72 horas de inoculação com isolados de *Colletotrichum fructicola*. Imagens de conídios dos isolado MANE 34 (A e B), MANE 41 (C e D), MANE 147 (E e F) e MANE 57 (G e H) germinaram e formaram apressórios na cutícula dos frutos e em seguida colonizaram abundantemente com hifas do fungo (seta) as células epidérmicas e do mesocarpo. Secções coradas com azul de toluidina (ATO) (A, C, E, G) mostram reação metacromática de parede celular das células e hifas do fungo com coloração roxa, muitas células reagiram à infecção fúngica pela acumulação de compostos fenólicos (cabeça de seta). Secções coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) (B, D, F, H) apresentam reação positiva para amido e parede celular. Apressório (ap), células epidérmicas (ep), conídio (cn), cutícula (ct). Barras 20 µm.....110

Figura 3.13. Porcentagem de conídios germinados (A), germinados com 1 apressório (B) e germinados com múltiplos apressórios (C) de isolados de *Colletotrichum fructicola* em frutos de maçã da cultivar Gala em diferentes estágios de desenvolvimento. Letras maiúsculas iguais nos estágios fenológicos para um mesmo isolado e minúsculas iguais para isolados dentro de um mesmo estágio não apresentam diferença significativa ($p \leq 0,05$) conforme determinado pelo teste de Tukey.....111

Figura 3.14. Esquema do processo infeccioso de isolados de *Colletotrichum fructicola* provenientes de frutos com PA (MANE 34 e 41) quando inoculados em frutos verdes, intermediários e maduros de maçã. Em frutos verdes (A) o conídio germina forma o apressório e fica quiescente em frutos com presença ou ausência de ferimentos pelo alto acúmulo de compostos fenólicos. Em frutos intermediários ou maduros para o isolado MANE 41 (B) o conídio germina, forma o apressório e fica quiescente quando não existe fermento, mas

quando existe a presença de um ferimento lesões nos frutos evoluem para podridão amarga.....113

Figura 3.15. Esquema do processo infeccioso do isolado MANE 147 de *Colletotrichum fructicola* provenientes de folhas com MFG em frutos de maçã verdes, intermediários e maduros. Durante os três estágios o conídio germina e forma dois apressórios. Em frutos verdes (A) o fungo fica quiescente na presença de ferimento pelo alto acúmulo de compostos fenólicos; frutos sem ferimentos apresentam pequenas lesões marrons. Em frutos intermediários hifas do fungo são observadas nas células do mesocarpo e nos frutos são observadas pequenas lesões marrons em presença ou ausência de ferimento. Em frutos maduros, com ferimento a lesão é pequena e restrita; em ausência de ferimentos a infecção fica quiescente nas células do mesocarpo e não são observadas lesões nos frutos...114

Figura 3.16. Esquema do processo infeccioso do isolado MANE 57 de *Colletotrichum fructicola* provenientes de folhas com MFG em frutos de maçã verdes, intermediários e maduros. Durante os três estágios o conídio germina e forma dois apressórios e coloniza massivamente as células epidérmicas e do mesocarpo. Em frutos verdes e intermediários são observadas pequenas lesões marrons que evoluem para podridão amarga (PA) nos frutos mesmo na presença de altas concentrações de compostos fenólicos. Em frutos maduros são observadas lesões de PA. Frutos nos três estágios de desenvolvimento quando feridos apresentam PA.....115

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2.

- Tabela 2.1.** Características dos estágios de desenvolvimento dos frutos de maçã da cultivar Gala e datas de inoculação de *Colletotrichum fructicola* durante os experimentos a campo.....65
- Tabela 2.2.** Incidência de frutos de maçã da cultivar Gala com lesões necróticas de coloração marrom, inoculados a campo com dois isolados de *Colletotrichum fructicola*. Avaliação realizada aos 20 dias após a inoculação... 68
- Tabela 2.3.** Dados meteorológicos mensais de precipitação, umidade relativa (UR%), Temperatura (°C), número de dias favoráveis (DF) à ocorrência de mancha foliar de Glomerella, registrados durante os experimentos nas safras de 2013/2014, 2014/2015 e 2015/2016 na Estação experimental da Epagri, localizada no município de São Joaquim, SC.....71
- Tabela 2.4.** Incidência de frutos de maçã cultivar Gala com pequenas lesões marrons ou com podridão amarga na fase de pós-colheita, aos seis meses após a conservação em câmara fria. Os frutos foram inoculados em campo com isolados de *Colletotrichum fructicola* em três estágios de desenvolvimento (J1: fruto verde; J2: fruto intermediário; J3: fruto no início da maturação).....75

Capítulo 3.

- Tabela 3.1.** Características e estágios de desenvolvimento de frutos de maçã da cultivar Gala coletados na Estação Experimental da EPAGRI localizada no município de São Joaquim-SC.....91
- Tabela 3.2.** Características dos isolados de *Colletotrichum fructicola* utilizados nas inoculações de frutos maçã da cultivar Gala em ensaios realizados em condições controladas..... 91

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
AP	Apressório
ATO	Azul de toluidina
BDA	Batata-dextrose-ágar
BSA	Albumina de soro bovino
CBB	Coomassie brilliant blue
CFT	Compostos fenólicos totais
cm	Centímetro
CN	Conídio
cv.	Cultivar
CT	Cutícula
DAI	Dias antes da inoculação
DAQP	Dias após a queda das pétalas
DC	Número de dias com chuva
DCC	Número de dias consecutivos com chuva
DF	Dias favoráveis à ocorrência da doença
DO	Densidade ótica
daqp	Dias após a queda das pétalas
EAG	Equivalente ácido gálico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EP	Células epidérmicas
FAL	Fenialanina-amônia liase
FAO	Food and Agriculture Organization
g	Gramas
HAI	Horas após a inoculação
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
M	Molar
m	Metro
Máx	Máxima
ME	Mesocarpo
MF	Massa Fresca
MFG	Mancha foliar de Glomerella
mg	Miligramas
min	Minuto
Mín	Mínima
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetro
m/v	massa/volumem

Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NS	Não significativo
nm	Nanômetros
nmol	Nanomol
PA	Podridão amarga
Pa	Precipitação acumulada
PAS	Ácido Periódico de Schiff.
pH	Potencial de hidrogênio
POX	Peroxidases
PR	Proteína relacionada à patogênese
PMF	Período de molhamento foliar
PVP	Polivinilpirrolidona
p/v	Peso / volume
spp.	Espécies
TG	Tubo germinativo
UR	Umidade relativa do ar
v/v	Volume/Volume
μL	Microlitros
μg	Microgramas
°C	Graus centígrados

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	35
2	OBJETIVOS	37
2.1	OBJETIVO GERAL.....	37
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3	CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA.....	39
3.1	A CULTURA DA MACIEIRA	39
3.2	<i>Colletotrichum</i> spp. NA CULTURA DA MACIEIRA.....	40
3.2.1	Mancha Foliar de Glomerella	40
3.2.2	Podridão Amarga	43
3.3	ETIOLOGIA E PROCESSO INFECCIOSO DE <i>Colletotrichum</i> spp. EM FRUTOS	44
3.3.1	Infecções quiescentes	46
3.3.2	Mecanismos de defesa em frutos	48
3.4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	53
4	CAPÍTULO 2 – PROCESSO INFECCIOSO DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum fructicola</i> EM FRUTOS DE MAÇÃ EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO A CAMPO E EM PÓS-COLHEITA.	61
4.1	RESUMO	61
4.2	INTRODUÇÃO.....	62
4.3	METODOLOGIA.....	63
4.3.1	Experimento a campo	63
4.3.2	Inoculação.....	64
4.3.3	Processo infeccioso de <i>Colletotrichum fructicola</i> em frutos de maçã.....	66
4.3.4	Delineamento experimental e análise estatística	67
4.4	RESULTADOS	67

4.4.1	Incidência de frutos com lesões a campo	67
4.4.2	Informações climáticas	70
4.4.3	Processo infeccioso de <i>C. fructicola</i> em frutos de maçã	73
4.4.4	Determinação de infecções quiescentes na fase de pós-colheita	75
4.5	DISCUSSÃO	77
4.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	82
5	CAPITULO 3 – MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ASSOCIADOS ÀS INTERAÇÕES DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum fructicola</i> com FRUTOS DE MAÇÃ em DIFERENTES ESTAGIOS DE DESENVOLVIMENTO	87
5.1	RESUMO	87
5.2	INTRODUÇÃO	88
5.3	METODOLOGIA	90
5.3.1	Obtenção dos frutos	90
5.3.2	Isolados utilizados	91
5.3.3	Teste de patogenicidade	92
5.3.4	Determinação de atividade de peroxidases, compostos fenólicos e fenilalanina amônia-liase.....	92
5.3.5	Processamento de tecidos de frutos infectados para microscopia de luz	94
5.3.6	Delineamento experimental e análise estatística dos dados	95
5.4	RESULTADOS	95
5.4.1	Patogenicidade dos frutos em laboratório	95
5.4.2	Atividade de peroxidases, fenilalanina amoniliase e compostos fenólicos.	99
5.4.3	Processo infeccioso de isolados de <i>Colletotrichum fructicola</i> em frutos de maçã com diferentes estágios de desenvolvimento ...	102
5.5	MODELO DA INTERAÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Colletotrichum fructicola</i> COM FRUTOS DE MAÇÃ DE DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO	112

5.6	DISCUSSÃO	115
5.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	119
6	CONCLUSÕES GERAIS	127

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Com o objetivo de melhorar a qualidade de vida, as pessoas vêm alterando seus hábitos alimentares, fazendo com que frutas e hortaliças sejam parte importante de uma dieta equilibrada e saudável. Nesse contexto, o consumo de maçãs no mundo tem crescido devido às pesquisas em relação aos potenciais benefícios que a fruta traz para a saúde, seja *in natura* ou beneficiada. As maçãs contêm fibras alimentares, hidratos de carbono, vitaminas, minerais e polifenóis (quercetina, catequina e ácido clorogénico), ajudando a prevenir doenças cardíacas e cancerígenas, melhorando a função pulmonar e a memória (BOYER & LIU, 2004).

A produção de maçã no mundo está concentrada nos países com clima temperado e subtropical. A China lidera a produção mundial com 40 milhões de toneladas/ano. Na América do Sul, os principais países produtores são Chile, Argentina e o Brasil (FAO, 2013). No Brasil, a cultura da macieira concentra-se nos estados do sul do país, onde é favorecida pelas condições ambientais. Os genótipos mais usados são os do grupo Gala e Fuji, e seus clones, por apresentarem características de cor, tamanho e sabor com grande aceitação no mercado (PETRI, 2006).

No estado de Santa Catarina, a cultivar Gala corresponde a 60% de área plantada, já que precisa de menor número de horas frio em comparação à cultivar Fuji. A cultivar Gala tem se mostrado suscetível a diferentes doenças, principalmente à mancha foliar de *Glomerella* (MFG), causada pelo fungo do gênero *Colletotrichum* sp. anteriormente chamada de mancha foliar da Gala pela alta suscetibilidade da cultivar (BLEICHER, 2006).

Os sintomas iniciais da MFG são manchas avermelhadas nas folhas com posterior desfolha prematura. Nos frutos, os sintomas são pequenas lesões marrom-avermelhadas que em alguns casos não evoluem para podridão amarga (PA) (BONETI et al., 2002). Outra doença causada por *Colletotrichum* na cultura é a PA em pós-colheita. Os sintomas característicos são lesões necrosadas deprimidas e com esporulação no centro. Dependendo da espécie de *Colletotrichum*, a esporulação pode ser escura ou parda (GONZALES et al., 2006).

Estas duas doenças têm uma grande importância na cultura da macieira e podem provocar desfolha prematura em 75% da planta e a podridão em mais de 50% dos frutos na cultivar Gala. O controle dessas doenças representa 20% dos custos da produção, e não se encontram registrados produtos com efeito curativo. Então, fazem-se necessárias aplicações excessivas de fungicidas preventivamente, cujos períodos de carência não permitem a aplicação próxima da colheita. Nesse estágio, é justamente o momento em que as condições são mais favoráveis para a doença, como altas temperaturas e ocorrência de chuvas prolongadas (HAMADA et al., 2012; KATSURAYAMA & BONETI, 2009; STADNIK et al., 2009).

Em virtude do exposto, torna-se imperativo o conhecimento do processo infeccioso do patógeno, tendo em vista que se carece de informações do ponto de vista epidemiológico no sentido de esclarecer os motivos pelos quais isolados que causam MFG não evoluem para PA e restringem-se a causar apenas pequenas lesões nos frutos. Outra questão é que a MFG e a PA vem sendo tratadas como doenças separadas sem saber ao certo se as lesões presentes no campo evoluem ou não para PA. Além disso, não se sabe qual é o estágio de desenvolvimento do fruto mais suscetível ao aparecimento da doença em campo e o momento ideal de infecção do fruto para o desenvolvimento da doença na fase de pós-colheita.

Desta forma, no presente trabalho foi estudado o processo infeccioso de isolados de *Colletotrichum fructicola* quanto à sua patogenicidade em campo e à detecção de infecções quiescentes nos diferentes estados fenológicos do fruto. Ainda, avaliaram-se os mecanismos de defesa dos frutos à doença. Assim pretende-se contribuir com o conhecimento das relações patógeno-hospedeiro e fornecer subsídios para o estabelecimento de estratégias eficientes e seguras para o controle da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a patogenicidade e o processo infeccioso de isolados de *Colletotrichum fructicola* em frutos de maçã de diferentes estágios de desenvolvimento, bem como as respostas de defesa do hospedeiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a diferente capacidade de isolados de *C. fructicola*, causadores de mancha foliar de Glomerella e podridão amarga, ocasionar pequenas lesões marrons ou podridão amarga em frutos de maçã em diferentes estágios de desenvolvimento;
- Determinar a capacidade desses isolados causarem infecções quiescentes em frutos inoculados no campo, em diferentes estágios de desenvolvimento, e armazenados em câmara fria;
- Quantificar enzimas relacionadas à patogênese (peroxidases e fenilalanina amônia liase) e compostos fenólicos totais em frutos de maçã em diferentes estágios de desenvolvimento após a inoculação de isolados de *C. fructicola*;
- Analisar por histopatologia o processo infeccioso de isolados de *C. fructicola* em frutos de maçã de diferentes estágios de desenvolvimento.
- Avaliar a capacidade de isolados de *C. fructicola* para germinar e formar apressórios na superfície de frutos de maçã em diferentes estágios de desenvolvimento;

3 CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A CULTURA DA MACIEIRA

O provável centro de origem da macieira (*Malus domestica* Borkh) se deu na região do Cáucaso e o Leste da China, sendo que alguns povos euro-asiáticos devem ter colaborado para a disseminação das formas primitivas da espécie. A macieira pertence à família Rosaceae, subfamília Pomoidae, gênero *Malus*, compreendendo 33 espécies. A planta é uma frutífera lenhosa, de pequeno a médio porte, caducifólia, e com formato variável. Os ramos possuem folhas simples, inteiras, ovado-elípticas ou ovado-oblongas, serradas ou crenadas e tomentosas na parte abaxial. As flores são brancas ou rosas dispostas em inflorescências hermafroditas denominadas umbelas. Os frutos são pomos, constituídos por um grande receptáculo carnudo que envolve os ovários, cujo endocarpo é coriáceo ou pétreo. Os frutos também são variáveis na coloração da epiderme, forma, textura e sabor da polpa. As espécies consideradas como principais componentes do *pool* gênico de *M. domestica* por estarem próximas taxonomicamente são *M. asiatica*, *M. baccata*, *M. micromalus*, *M. orientalis* e *M. sieversii* (BLEICHER, 2006; IUCHI, 2006;).

No mundo, a maçã é a terceira fruta mais produzida, segundo os dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). No ano de 2013, a produção mundial de maçã superou 75 milhões de toneladas, sendo a China o maior produtor, enquanto o Brasil ocupou o 12º lugar com uma produção de 1,23 milhão de toneladas (FAO, 2013). No Brasil, o consumo de maçãs é de 5,6 Kg/habitante/ano, sendo a terceira fruta com maior consumo no país, atrás apenas da laranja e da banana (BNDES, 2012).

A cultura da macieira no Brasil encontra-se concentrada no sul do país, já que esses estados possuem as melhores condições, como é o suficiente número de horas-frio para atender as necessidades da cultura. Em Santa Catarina, existem dois polos que são os principais produtores do estado. Um deles localiza-se em Fraiburgo e seus municípios vizinhos (Monte Carlo, Lebon Régis, Tangará, Água Doce e Santa Cecília). Esses municípios, durante os anos de 2001 a 2009, foram responsáveis por 30% da produção nacional. Outro polo produtor de maçã localiza-se na região serrana, em São Joaquim e o entorno (Bom

Jardim da Serra, Urubici, Urupema, Bom Retiro e Lages) com uma produção média de 20% (BNDS, 2010).

Ao todo, Santa Catarina produz anualmente 660 mil toneladas (49% da produção nacional), abrangendo uma área de 19 mil hectares (IBGE, 2013). As principais cultivares são Gala e Fuji, as quais apresentam características desejáveis como a coloração vermelha da epiderme, tamanho e alta produção. A cultivar Gala começa a ser colhida no mês de fevereiro e representa 60% da produção nacional. A cultivar Fuji representa 30% da produção nacional e sua colheita se dá no mês de abril e é uma cultivar mais resistente para frigo-conservação (PETRI *et al.*, 2011).

3.2 *Colletotrichum* spp. NA CULTURA DA MACIEIRA

O gênero *Colletotrichum* é cosmopolita, considerado um dos principais agentes causais de doenças na agricultura e responsável pela deterioração de frutos em pré e pós-colheita, em áreas de climas temperados, assim como em áreas subtropicais e tropicais. As principais injúrias causadas às plantas são a desfolha prematura, podridão ou necrose da raiz, flores e frutos, sendo este último uma das mais importantes (WHARTON E DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004). Na cultura da maçã, o fungo é causador da mancha foliar de *Glomerella* e da podridão amarga dos frutos.

3.2.1 Mancha foliar de *Glomerella*

A mancha foliar de *Glomerella* (MFG), inicialmente chamada de mancha foliar da Gala, mancha da Gala e mancha das folhas e frutos de macieira, foi reportada em Porto Amazonas – PR no ano de 1983 afetando plantas da cv. Gala, as quais apresentavam desfolhamento severo. Atualmente, é considerada a principal doença de verão da cultura de macieira no Brasil e encontra-se disseminada praticamente por todas as regiões produtoras, inclusive em altitudes de 1400 m acima do nível do mar (BLEICHER *et al.*, 2000; KATSURAYAMA & BONETI, 2009; VALDEBENITO-SANHUEZA *et al.*, 2002).

Os principais agentes causais da MFG são espécies do gênero *Colletotrichum* pertencentes a três grandes complexos. No recente

estudo de Weir et al. (2012), *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* foram reclassificados em três grandes complexos:

1. *C. gloeosporioides*, onde estão as espécies *C. fructicola* e *C. siamense*,
2. *C. acutatum*, onde se encontram as espécies *C. nympheae*, *C. melonis*, e *C. paranaense*
3. *C. boninense* que apresenta a espécie *C. karstii*.

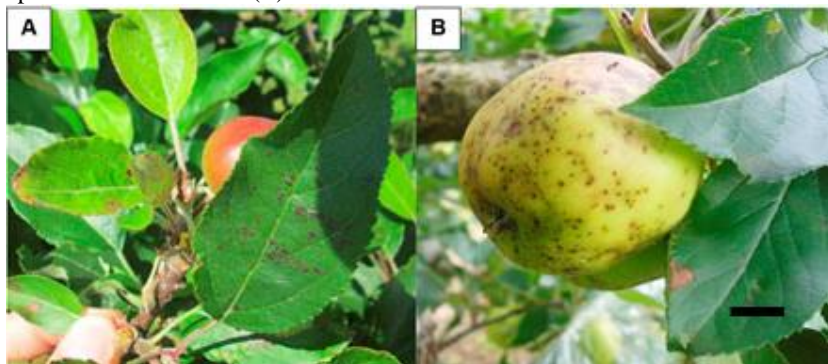
Todas essas espécies nomeadas causam doenças na macieira (VELHO et al., 2015; DAMM et al., 2012; BRAGANÇA et al., 2016).

Em estudo recente foi constatado por análise filogenética molecular multilocos que isolados coletados em pomares de Santa Catarina e Rio Grande do Sul apresentaram grande variabilidade genética sendo *C. fructicola* a espécie a mais frequente (VELHO et al., 2015). Nos estados do sul do Brasil, períodos prolongados de molhamento foliar, temperaturas elevadas e alta umidade relativa do ar são as condições ideais para o desenvolvimento da doença (BONETI et al., 2002; CRUSIUS et al., 2002; HAMADA, 2005; HAMADA 2013).

Os principais sintomas da doença são manchas foliares variando de vermelho a roxo, as quais evoluem para manchas necróticas com formato irregular (Fig. 1A). Uma vez que essas lesões coalescem, as folhas lesionadas amarelecem e caem precocemente, causando na planta uma desfolha prematura (CRUSIUS et al., 2002).

Além das folhas, o agente causal da MFG afeta também os ramos verdes, onde se observam lesões longitudinais, de cor marrom clara e vão se tornando corticentas e com bordas salientes. No fruto, o agente da MFG produz numerosas pontuações deprimidas, de aproximadamente 1 a 2 mm de diâmetro e de cor marrom-clara a marrom escura (Figura 1.1B). Estas lesões normalmente não evoluem para podridão amarga. O período de incubação nos frutos é de 4 a 6 dias, porém pode-se estender até 12 dias (KATSURAYAMA e BONETI, 2009).

Figura 1.1. *Colletotrichum fructicola* provocando mancha foliar de Glomerella em folhas, com lesões marrons irregulares (A) e pequenas lesões marrons aprofundadas em frutos (B). Barra indica 1 cm.



Fonte: Autor

A principal forma de sobrevivência de *Colletotrichum* durante os períodos de dormência da planta, são gemas dormentes, ramos e folhas caídas no chão (CRUSIUS et al., 2002; HAMADA, 2013). A principal forma de disseminação da MFG é através da chuva pois o fungo depende de água para liberar os conídios contidos em uma mucilagem que são dispersos por vento, respingos e escorrimento na planta. Ao alcançarem frutos e outros tecidos verdes, e na presença de alta umidade por períodos prolongados, os conídios podem germinar e causar a infecção. A doença também pode ser introduzida no pomar através de mudas infectadas (KATSURAYAMA & BONETI, 2009; MADDEN et al., 1996; MENEZES, 2006).

A infecção de *Colletotrichum* em folhas e frutos é favorecida por períodos de molhamento foliar (PMF) prolongados e temperaturas moderadas. Por exemplo, sob temperatura entre 25 e 28°C, são necessários em média 8 horas de PMF, e os sintomas surgem após 45 horas. Para temperaturas baixas ($\leq 16^{\circ}\text{C}$) o PMF mínimo é de 16 horas. Para os frutos, os PMF são maiores do que nas folhas, em condições de temperaturas de 24°C, os frutos precisam no mínimo de 96 horas de PMF para serem infectadas (KATSURAYAMA & BONETI, 2009; HAMADA, 2005).

O controle químico mediante a pulverização de fungicidas é o método mais utilizado para o controle da doença. Dentre os fungicidas, os de contato são os mais aplicados, principalmente os do grupo dos

ditiocarbamatos (Mancozebe, Metiram e Propinebe). O uso de produtos alternativos aos fungicidas também tem sido estudado na cultura da macieira (KATSURAYAMA & BONETI 2012,). Para o controle da MFG, e a ulvana com controle da doença de 65% demonstram-se promissores com níveis de controle em torno de 60 a 65% (ARAUJO *et al.*, 2008; ARAUJO *et al.*, 2010). Bactérias do filo plano de folhas de maçã têm sido utilizadas como controle biológico para MFG em plântulas de macieira em condições de casa de vegetação, mas a nível de campo, não foram observados os mesmos resultados (MOREIRA *et al.*, 2014; MOREIRA & DE MIO, 2015).

3.2.2 Podridão Amarga

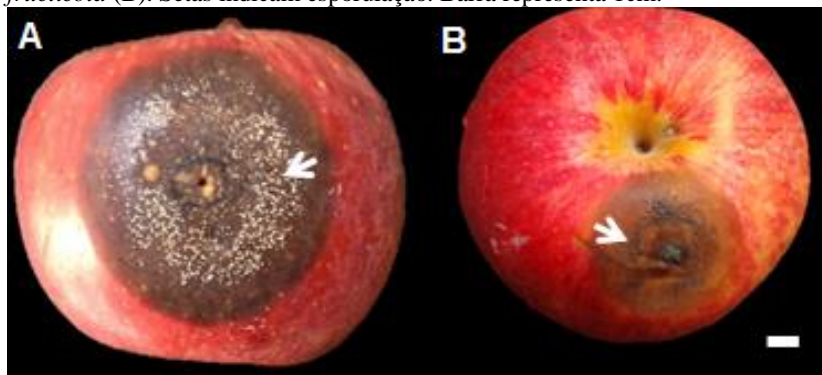
A podridão amarga (PA) é causada por espécies que pertencem aos complexos *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, ocorrendo em todos os lugares onde é cultivada a macieira. Ocasionalmente causa maior severidade em lugares de estação com clima quente e úmido, podendo chegar a causar perdas de até 50%. No Brasil, a doença causa sérios problemas na cultivar Golden Delicious e seus clones como Gala, provocando perdas de até 20%. Após a queda das pétalas, os frutos podem ser infectados e podem ser observados os primeiros sintomas da doença, como pequenas manchas de 2 a 3 mm de diâmetro de coloração marrom (Figura 1.1B). Esta pequena lesão vai aumentando de tamanho e, ao mesmo tempo, se aprofundando na polpa do fruto (BLEICHER *et al.*, 2002; GONZALES & SUTTON 2004; GONZALES *et al.*, 2006).

Quando a lesão apresenta de 2 a 3 centímetros de diâmetro, pode ser observada uma depressão no centro da lesão com os bordos elevados (Figura 1.2B). Sob condições ideais como alta umidade, surgem numerosos acérvulos de coloração salmão-creme (Figura 1.2A). Alguns isolados de *Colletotrichum* produzem conídios de cor escura (Figura 1.2B). As lesões avançam em profundidade em forma cônica até o centro do fruto (BLEICHER, 1997; MONDINO *et al.*, 2009; BONETI *et al.*, 2002).

Em campo, a medida de controle é a retirada e destruição de frutos infectados. No controle químico, os produtos recomendados são os de fungicidas de contato (Captan, Dithianon, Chorothalonil) e doses baixas de cúpricos (VALDEBENITO-SANHUEZA *et al.*, 2002). Em pós-colheita, o uso de indutores de resistência como a quitosana tem se

mostrado promissores no controle da doença (FELIPINI & DI PIERO, 2009). Controle biológico tem sido relatado para o controle da PA na pós-colheita pelo uso de leveduras e *Bacillus* sp. (Biosave, Serenade e Sonata) (JANISIEWICZ, 1991)

Figura 1.2. Frutos de maçã com podridão amarga apresentando alta esporulação de coloração salmão-creme (A) e esporulação escura de *Colletotrichum fructicola* (B). Setas indicam esporulação. Barra representa 1cm.



Fonte: Autor

3.3 ETIOLOGIA E PROCESSO INFECCIOSO DE *Colletotrichum* spp. EM FRUTOS

O gênero *Colletotrichum* pertence à ordem Melanconiales da classe Coelomycetes. Este fungo apresenta-se abundantemente em áreas tropicais e subtropicais afetando monocotiledôneas e dicotiledôneas com aproximadamente 470 hospedeiros. *Colletotrichum* spp. causam antracoses em uma grande variedade de frutas como abacate, banana, manga, goiaba, morango, mamão, uvas e cítricos (BAILEY, 1992; PRUSKY E PLUMBLEY, 1992).

Seus conídios são hialinos, ligeiramente curvados, formando massas envolvidas por uma substância mucilaginosa, cor rosada ou escura visível a olho nu. O micélio é septado, de coloração hialina ou castanho claro. Os apressórios são clavados, ovalados ou lobados, de coloração castanha clara, esta coloração clara é dada pela síntese de proteínas requeridas para a produção de melanina. Apressórios de *C. fructicola* têm sido descritos como predominantemente oval e forma sésil para isolados provenientes de MFG ou pedicelado para isolados

provenientes de frutos com PA. Os acérvulos separados têm forma de disco e podem encontrar-se na forma subepidermal, epidermal ou subcuticular (ARAUJO et al., 2014; BAILEY, 1992; MENEZES E HANLIN 1996; VELHO *et al.*, 2016)

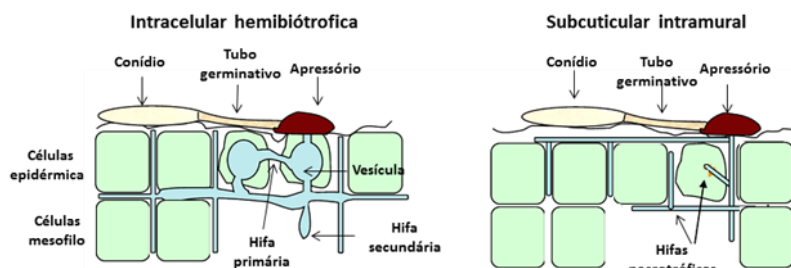
Os conídios, logo após a germinação, produzem um apressório com melanização, diretamente relacionada à patogenicidade do fungo. O apressório fica aderido à superfície do fruto por meio de uma mucilagem hemicelulósica que não se solta facilmente com a chuva. Uma vez germinado em um período de 12 a 24 horas, o fungo produz o *peg* de penetração que emerge e forma a hifa infectiva, a qual penetra diretamente a cutícula colonizando a parede celular das células do hospedeiro (DEISING et al., 2000; MENEZES E HANLIN 1996; PERES et al., 2005).

Após a pré-penetração ou penetração, existem duas estratégias de colonização que segundo Bailey et al., (1992) podem ser: intracelular hemibiotrófica ou subcuticular intramural necrotrófica (Figura 1.3).

Durante a primeira estratégia, o patógeno cresce biotroficamente, de forma assintomática, com o crescimento da hifa dentro do lúmen celular, sem penetração no protoplasma, formando a vesícula de infecção. Após a colonização de uma ou duas células, a hifa primária intracelular é formada a partir da vesícula, originando uma hifa secundária e iniciando a fase necrotrófica (O'CONNEL et al., 2000).

A segunda estratégia de colonização, a subcuticular intramural necrotrófica, é caracterizada pelo crescimento do patógeno abaixo da cutícula e dentro da parede periclinal e anticlinal das células epidérmicas. Nessa forma, o patógeno cresce e dissolve a matriz péctica das células epidérmicas através da formação de hifas secundárias finas que crescem inter e intracelularmente, enquanto secretam enzimas que degradam a parede celular e matam as células do hospedeiro (BAILEY, 1992; WHARTON & DIÉGUES-URIBEONDO, 2004).

Figura 1.3. Estratégias de colonização de diferentes espécies de *Colletotrichum*. Na intracelular hemibiotrófica, o conídio germina e forma na extremidade do tubo germinativo o apressório melanizado, o qual emite o *peg* de penetração e posteriormente a hifa primária. Após colonizar novas células epidérmicas, ocorre a formação da hifa secundária. Na colonização subcuticular intramural, o conídio germina, forma o tubo germinativo e apressório melanizado. A cutícula do hospedeiro é rompida pelo *peg* de penetração e a hifa se desenvolve subcuticularmente. Em estágios mais avançados, a hifa penetra nas células epidérmicas e do mesófilo. (Adaptado de PERFECT et al., 1999; MILES e SCHILDER, 2013).



Fonte: PERFECT et al., 1999; MILES e SCHILDER, 2013

3.3.1 Infecções quiescentes

Uma das características importantes de *Colletotrichum* é a sua capacidade de sobreviver em estado de quiescência, quando as condições ambientais ou fisiológicas no hospedeiro impedem o seu desenvolvimento (Figura 1.4). As mudanças bioquímicas que ocorrem durante a maturação dos frutos são as que fazem que se continue o processo infeccioso do patógeno.

Existem três principais fatores que levam o fungo a entrar na fase quiescente:

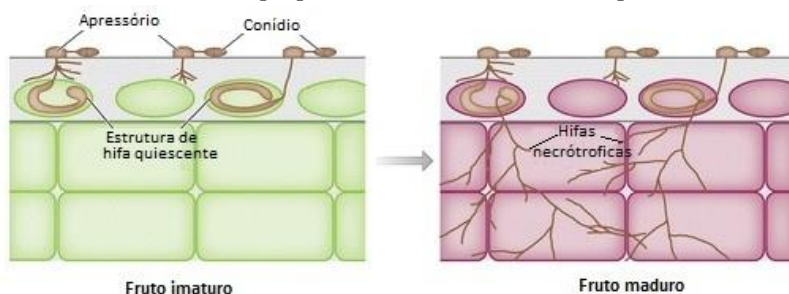
1. Deficiência no hospedeiro de recursos nutricionais requeridos pelo patógeno para o seu desenvolvimento;
2. Presença de compostos antifúngicos ou de estruturas pré-formadas na resistência de frutos imaturos; e
3. Um ambiente inadequado para a ativação dos fatores de patogenicidade do microrganismo.

Segundo Yerhoeff (1974), uma relação parasítica quiescente se define como uma condição na qual o patógeno reduz a sua atividade metabólica, detendo o processo infeccioso por um período considerável durante a vida do hospedeiro, e ele é reativado quando as condições fisiológicas e ambientais específicas para o seu desenvolvimento estejam presentes.

Segundo Swimburne (1983), um organismo se pode tornar quiescente em qualquer das seguintes etapas do seu desenvolvimento: na germinação, alongação do tubo germinativo, na formação do apressório ou na penetração. O ponto de infecção se desenvolve quando a hifa penetra a cutícula e a parede celular do hospedeiro, com a ajuda de enzimas cutinases e celulolíticas.

Para De Lapeyre (2000), o estado quiescente se define como a circunstância na qual um conídio que entra em contato com a superfície do fruto, germina e forma o apressório que se melaniza e permanece inativo até a maturação do fruto.

Figura 1.4. Processo de infecção quiescente em frutos. Em frutos verdes, o conídio germina, forma o apressório e penetra através do *peg* de penetração para formar as hifas quiescentes nas células epidérmicas do fruto, permanecendo em repouso até o amadurecimento. Quando o fruto amadurece, formam-se as hifas secundárias necrotróficas que penetram as células do mesocarpo.



Fonte: PRUSKY *et al.*, 2013

A fase quiescente que afeta as flores pode variar de duas a três semanas, enquanto que para os frutos, essa fase pode durar vários meses. A duração de cada período pode variar entre patógenos, hospedeiros e estágios de desenvolvimento. Patógenos como *Colletotrichum*, *Monilia*, *Botrytis* e *Alternaria* podem permanecer quiescentes por longos períodos durante o desenvolvimento do fruto,

mas iniciam a sua fase necrotrófica imediatamente na maturação ou senescência dos frutos (BAILEY *et al.*, 1992; PRUSKY E LISCHTER, 2007).

Durante a quiescência do patógeno dentro do hospedeiro, há uma dinâmica de equilíbrio entre o hospedeiro, o patógeno e o ambiente, de forma que as mudanças fenológicas e fisiológicas no hospedeiro, no ambiente ou em ambos, podem levar à perda do equilíbrio estabelecido e permitir que o patógeno continue seu ataque (JARVIS, 1994).

A participação do etileno na terminação da quiescência se deve à habilidade de *Colletotrichum* spp. para desenvolver um mecanismo onde usa o hormônio de maturação do hospedeiro como sinal para reativar o processo de infecção. Este mecanismo evita o contato do patógeno com tecidos do hospedeiro que contêm altos níveis de compostos antifúngicos (FLAISHMAN E KOLATTUKUDY, 1994).

O patógeno, no período de quiescência, mantém um baixo nível de metabolismo, entretanto, ele pode ativar fatores de patogenicidade que resultam em um parasitismo ativo nos tecidos do hospedeiro. Esta transição da fase quiescente para a fase de infecção pode ser ativada por mudanças fisiológicas normais do hospedeiro, condições ambientais adversas, pelo manuseio incorreto ou como em alguns frutos pelo declínio na concentração de compostos antifúngicos (PRUSKY & PLUMBLEY, 1992; JARVIS, 1994; CAPPELINI 1984).

3.3.2 Mecanismos de defesa em frutos

Os frutos, de maneira similar às folhas, apresentam resistência à penetração de patógenos. Esses tipos de defesas podem ser estruturais, como barreiras físicas para deter o crescimento do patógeno tais como as cutinas, ceras, tricomas entre outros ou do tipo bioquímico com a formação de compostos tóxicos para os patógenos como espécies reativas de oxigênio dentro da célula para formar um lugar hostil para o desenvolvimento dos patógenos, contendo alcaloides, compostos fenólicos ou terpenos (WOOD, 2012).

O termo espécies reativas de oxigênio (ERO) é usado para descrever os produtos da remoção sequencial de elétrons do oxigênio molecular (O₂). As ERO se formam naturalmente no interior da célula, nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, como produtos

secundários oriundos da fotossíntese e respiração (APEL & HIRT, 2004). Entretanto, são produzidas em excesso logo após o reconhecimento de um patógeno pela planta (TORRES & DANGL, 2005).

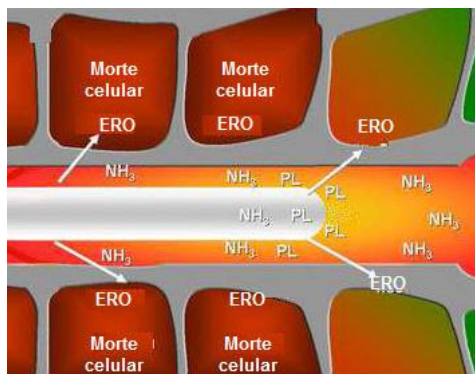
Dentro dessas ERO, os agentes que causam a explosão oxidativa são o oxigênio molecular (O_2) que é relativamente estável e a sua ativação influencia no sistema biológico. O superóxido ($O_2^{\cdot -}$) pode ser produzido em plantas pela ativação de NADPH-oxidases/síntases ligadas à membrana, peroxidases (POX) da parede celular e lipoxigenases (LOX) como resultado da transferência de elétrons da mitocôndria ou do cloroplasto.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um oxidante relativamente estável e tem a capacidade de difundir-se rapidamente através da membrana celular favorecendo a rápida elicitação de respostas de defesa em plantas. O radical hidroxila (OH) apresenta meia-vida curta e alta afinidade a biomoléculas. Outra ERO é o oxigênio simples (1O_2), que é altamente destrutivo e reage com a maioria das moléculas, causando danos aos sítios próximos onde eles são produzidos, ou seja, próximos aos cloroplastos (RESENDE et al., 2003).

Em frutos, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é dependente da fase fisiológica da maturação. Durante a quiescência, uma das primeiras respostas de defesa detectáveis durante a penetração de *C. gloeosporioides* em frutos verdes resistentes de abacate, foi a geração localizada de ERO, enquanto nenhum aumento significativo dessas moléculas foi observado em frutos maduros (PRUSKY et al., 1988).

A produção de ERO pelo hospedeiro tem dois efeitos opostos durante a transição do patógeno de quiescente para infecção ativa. Por um lado, o acúmulo de ERO é um potencial mecanismo de defesa que limita o patógeno durante a sua fase biotrófica. Por outro lado, a morte celular induzida pela ERO pode levar à formação de tecido necrótico a partir do qual os patógenos quiescentes podem obter os nutrientes que precisam para o seu desenvolvimento durante a sua fase necrotrófica ou de outros patógenos hemibiotróficos ou necrotróficos presentes no tecido (Figura 1.5) (BAARLEN et al. 2004).

Figura 1.5. Modelo para a ativação de infecções quiescentes em patógenos de pós-colheita. Neste modelo se descreve o aumento da patogenicidade de *Colletotrichum* spp. pela amonificação do tecido do hospedeiro (PL e NH_3), e as respostas de defesa nas células dos frutos pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Essa produção pode levar a uma morte celular dos tecidos necrosando-os rapidamente e facilitando o processo infeccioso dos patógenos (PL: Pectatoliase, NH_3 : Amônio, ERO: Espécies reativas de Oxigênio).



Fonte: PRUSKY E LICHTER 2008

As peroxidases (POX) são enzimas glicoproteicas capazes de catalisar um grande número de reações na eliminação das EROs. Elas participam principalmente nos mecanismos de defesa das plantas e estão diretamente associadas à deposição de lignina, suberização e cicatrização de ferimentos. Em frutos imaturos de maçã, foi observado que houve aumento nos níveis de H_2O_2 como resposta à infecção de *Penicillium expansum* (TORRES et al., 2003). Em citrus, a atividade da enzima foi suprimida pela interação compatível Citrus-*P. digitatum*, mas quando inoculado com *P. expansum* (interação incompatível) houve aumento no acúmulo de H_2O_2 (MACARISIN et al., 2007; VALENTINES et al., 2005).

A alteração das peroxidases também tem sido relatada no patossistema Macieira - *Colletotrichum* spp. na resistência de plântulas de maçã à MFG com aumento significativo das peroxidases após infecção do patógeno (ARAUJO et al., 2013a). Nesse mesmo patossistema foi observado que plântulas inoculadas com isolados provenientes de MFG exibiram aumento na atividade da enzima 24 HAI (VELHO et al., 2016).

Outra maneira de atuação das ERO é na formação de barreiras físicas como a lignina e suberina. Foi observada a produção de lignina em maçãs imaturas infectadas com *P. expansum* (interação compatível) e *P. digitatum* (interação incompatível) 24 HAI e em frutos imaturos de laranja às 48 HAI, diminuindo a produção de lignina em frutos maduros (VILANOVA et al., 2012b).

Por outro lado, as ERO também são importantes na ativação de outras enzimas de defesa como a Fenilalanina amônia-liase (FAL), que pode ser influenciada pelos níveis de nutrientes, estágios fenológicos, luz e pela infecção de frutos por patógenos. A FAL catalisa a desaminação da L-fenilalanina para a formação do ácido transcinâmico que constitui os primeiros passos na via dos fenilpropanóides, resultando em compostos como as fitoalexinas com propriedades antimicrobianas e a formação de lignina na parede celular, o que confere maior resistência à infecção de patógenos (TORRES et al., 2006). Em laranjas, foi observado que a expressão de genes FAL1 e POX1 foram incrementadas pela infecção com *P. digitatum* e tratamento posterior com calor como método de controle (BALLESTER et al., 2010).

Os compostos fenólicos encontram-se envolvidos na defesa das plantas. Os pré-formados são compostos antibióticos como os fenóis simples, ácidos fenólicos, flavonóides e dihidrochalconas. Os compostos fenólicos pós-formados são aqueles que são sintetizados em resposta à infecção de patógenos. Esta resposta de defesa envolve o rápido aumento dos compostos fenólicos específicos no local infectado, particularmente as fitoalexinas que podem inibir o crescimento de uma ampla gama de patógenos (MACHEIX et al., 1990; LATANZZIO et al., 2006).

Em diferentes estudos têm sido observada a alteração dos compostos fenólicos pela invasão dos patógenos em seus hospedeiros. Frutos imaturos de abacate foram resistentes à infecção de *C. gloeosporioides* pela alta concentração do dieno, um composto antifúngico que fez com que o fungo permanecesse quiescente até o fruto estar maduro, quando foram observadas as menores concentrações desse composto (PRUSKY & KEEN, 1993; PRUSKY et al., 1982).

Compostos como o α – tomatina presente em casca de frutos verdes de tomate em níveis elevados contribuem para a resistência de tomates imaturos à infecção de *Botrytis cinerea* (QUIDDE, et al., 1998;

VERHOEFF et al., 1975). Em citrus foi estudada a expressão de genes e níveis de metabólitos envolvidos na via dos fenilpropanoides, observado-se um aumento significativo no acúmulo de metabólitos como flavononas, flavonas e escoparonas que atuam como fitoalexinas em resposta à infecção de *P. digitatum* (BALLESTER et al., 2013).

3.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, L.; STADNIK, M. J.; BORSATO, L. C.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. 2008. **Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da Gala em macieira**. Tropical Plant Pathology, Viçosa, v. 33, n. 2, p. 148-152.

ARAÚJO L., VALDEBENITO-SANHUEZA R.M., STADNIK M.J. 2010. **Avaliação de formulações de fosfito de potássio sobre *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro e no controle pós-infeccional da mancha foliar de *Glomerella* em macieira**. Tropical Plant Pathology v. 35, p.54- 59.

ARAÚJO, L., & STADNIK, M. J. 2013a. **Cultivar-specific and ulvan induced resistance of apple plants to *Glomerella* leaf spot are associated with enhanced activity of peroxidases**. Acta Scientiarum, 35(3), 287–293.

ARAÚJO, L., & STADNIK, M. J. 2013b. **Múltiplos apressórios e tubos de anastomoses conidiais no processo infeccioso de *Colletotrichum gloeosporioides* em macieira**. Bragantia, 72(2), 180–183.

ARAÚJO, L., GONÇALVES, A. E., & STADNIK, M. J. 2014. **Ulvan effect on germination and appressoria formation of *Colletotrichum gloeosporioides***. Phytoparasitica, v. 42 n. 5, p. 631–640.

BAARLEN, P., STAATS, M., KAN, J.A.L. 2004. **Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica***. Molecular Plant Pathology 5: pp. 559-574

BAILEY, J.A.; JEGGER, M.J. 1992. ***Colletotrichum*: Biology, pathology and control**. England: CAB Internacional Wallingford, 338 p.

BALLESTER, A. R., IZQUIERDO, A., LAFUENTE, M. T., & GONZÁLEZ- CANDELAS, L. 2010. **Biochemical and molecular characterization of induced resistance against *Penicillium digitatum* in citrus fruit**. Postharvest Biology and Technology, v. 56, p. 31-38.

BLEICHER, J. **História da Macieira**. 2006. In. EPAGRI. A cultura da macieira. Florianópolis-SC, 743p.

BNDES. 2010. Fruticultura: **A produção de maçã no brasil**. Informativo técnico Seagri, n.2.

BONETI JI DA S, KATSURAYAMA Y, BLEICHER J. 2002. **Doenças da macieira**. In: EPAGRI (Ed.) A Cultura da Macieira. Florianópolis, Epagri, pp. 527-593.

BOYER JEANELLE, LIU RUI HAI. 2004. **Apple phytochemicals and their health benefits**. Nutrition Journal. 3, 1-15.

BRAGANÇA, C. A. D., DAMM, U., BARONCELLI, R., MASSOLA JÚNIOR, N. S., & CROUS, P. W. (2016). **Species of the *Colletotrichum acutatum* complex associated with anthracnose diseases of fruit in Brazil**. Fungal Biology, 120(4), 547-561.

CAPELLINI, R.A., CEPONIS, M.J. 1984. **Postharvest losses in fresh fruits and vegetables**. In Postharvest pathology of fruits and vegetables, University of California, Agricultural Experiment Station, 24-30.

CRUSIUS LU, FORCELINI CA, SANHUEZA RMV, FERNANDES JMC. 2002. **Epidemiology of apple leaf spot**. Fitopatologia Brasileira 27:65-70.

DAMM, U.; CANNON, P.F.; WOUTENBERG, J.H.C.; JOHNSTON, P.R.; WEIR B.S.; TAN, Y.P.; SHIVAS, R.G.; E CROUS, P.W. 2012. **The *Colletotrichum boninense* species complex**. Studies in Mycology, v. 73, p.1-36.

DEISING, H.B.; WERNER, S.; WERNITZ, M. 2000. **The role of fungal appressoria in plant infection**. Microbes and infection, v. 2, n. 13, p. 1631-1641.

DE LAPEYRE B. L., CHILLET M., DUBOIS C., MOURICHON X.. 2000. **Importance of different sources of inoculum and dispersal methods of conidia of *Colletotrichum musae*, the causal agent of banana anthracnose, for fruit contamination**. Plant Pathol. 49, 782-790

FLAISHMAN, M., KOLATTUKUDY, P. E. 1994. **Timing of fungal invasion using host's ripening hormone as a signal**. Proceedings of the National Academy of Sciences, 91,6579-6583.

FELIPINI, R. B., & DI PIERO, R. M. 2009. **Redução da severidade da podridão-amarga de maçã em pós-colheita pela imersão de frutos em quitosana**. Pesquisa Agropecuária Brasileira. v.44, n.12, p.1591-1597.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Production-crops. Disponível em <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acessado em Julho de 2016.

GONZALEZ, E., SUTTON, T.B. 2004. **Population diversity within isolates of *Colletotrichum* spp. causing Glomerella leaf spot and bitter rot of apples in three orchards in North Carolina**. Plant disease, v. 88, n. 12, p. 1335-1340.

GONZALEZ, E., SUTTON, T.B., CORREL, J.C. 2006. **Clarification of the etiology of Glomerella leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular, and pathogenicity tests**. Phytopathology.96.982-992.

HAMADA, N.A. 2005. **Influência da temperatura e do período de molhamento foliar (PMF) na incidência e severidade da Mancha Foliar da Gala (*Colletotrichum* spp.)**. Agropecuária Catarinense, v. 18, n. 2, p.73-77.

HAMADA, N. A., NESI, C. N., ALVES, G., MAY-DE-MIO, L. L. 2012. **Fungicidas associados ou não a fosfitos no controle da mancha foliar de glomerela em macieira**. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, v.7, p. 831-837, suplemento.

HAMADA, N. A. 2013. **Epidemiologia da mancha foliar de glomerella em macieira**. Tese (doutorado). Universidade Federal de Paraná, Curitiba-PR, p 117.

IUCHI, V.L. 2006. **Botânica e fisiologia**. In: EPAGRI. A Cultura da Macieira. Florianópolis, p. 59-104.

JANISIEWICZ, W. J. **Control of postharvest fruit diseases**. In: ARORA, D. K.; RAI, B.; MUJERK, K. G.; KNUDSEN, G. R. (Ed.). *Handbook of Applied Mycology*, v. 1, p. 301-326, 1991.

JARVIS, W. 1994. **Latent infections in the pre and postharvest environment**. *Horticultural Science*, 29, 749-750.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I.S.; BECKER, W.F. 2000. **Mancha foliar da gala: principal doença de verão da cultura da macieira**. *Agropecuária catarinense*, v. 13, p. 14-20.

KATSURAYAMA, Y & BONETI, J.I.S. 2009. **Manejo das doenças de verão da macieira no sul do Brasil** In: STADNIK MJ (Ed.) *Manejo Integrado de Doenças da Macieira*. Florianópolis, CCA-UFSC, p. 45-64.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I.S. 2012. **Manejo da mancha da gala**. *Agropecuária catarinense*, v. 25, n. 2, p. 45-51,. Suplemento.

LATTANZIO V., LATTANZIO V.M.T., CARDINALI A., 2006. **Role of polyphenols in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects**. In: Imperato F., ed. *Phytochemistry: advances in research*. Trivandrum, Kerala, India: Research Signpost, p. 23-67.

MACARISIN D., COHEN L., EICK A., RAFAEL G., BELAUSOV E., WISNIEWSKI M., DROBY S. 2007. **Penicillium digitatum Suppresses Production of Hydrogen Peroxide in Host Tissue During Infection of Citrus Fruit**. *Phytopathology*, 97, p. 1491-1500

MACHEIX J., FLEURIET A. & BILLOT J., 1990. **Phenolic compounds in fruit processing**. In: Macheix J., Fleuriet A. & Billot J., eds. *Fruit phenolics*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 239-312.

MADDEN, L.V. 1992. **Rainfall and the dispersal of fungal spores**. *Advances in Plant Pathology*, v. 8, p. 39-79.

MENEZES, M., HANLIN, R.T. **Apressoria of Brazilian isolates of Colletotrichum gloeosporioides, causal agent of anthracnoses diseases**. *Revista de Microbiologia*, v. 27 p. 247-251. 1996.

MENEZES, M. **Aspectos Biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum***. 2006. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica, 3, 170-179.

MILES D.T., SCHILDER C.A., 2013. **Host Defenses associated with Fruit Infection by *Colletotrichum* Species with an Emphasis on Anthracnose of Blueberries**. Plant Management Network.

MONDINO, P.; DI MASI, S.; FALCONÍ, C.; MONTEALEGRE, J.; HENRIQUEZ, J.L.; NUNES, C.; SALAZAR M.; STADNIK, M.J.; VERO, S.; USALL, J. 2009. **Manual de identificación de enfermedades de manzana en poscosecha**. Udelar-Cyted, 67p.

MOREIRA, R. R., NESI, C. N., & DE MIO, L. L. M. 2014. ***Bacillus* spp. and *Pseudomonas putida* as inhibitors of the *Colletotrichum acutatum* group and potential to control *Glomerella* leaf spot**. Biological Control, 72, 30-37.

MOREIRA, R. R., & DE MIO, L. L. M. 2015. **Potential biological agents isolated from apple fail to control *Glomerella* leaf spot in the field**. Biological Control, 87, 56-63.

O'CONNELL, R.J., PERFECT, S., HUGHES, B., CARZANIGA, R., BAILEY, J., & GREEN, J. 2000. **Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. Host specificity, pathology, and host-pathogen interaction of *Colletotrichum***. American Phytopathology Society Press, St Paul, 57-77.

PERES, N.A.; TIMMER, W.; ADASKAVEG, J.E.; CORRELL, J.C. 2005. **Lifestyles of *Colletotrichum acutatum***. Plant Disease, v.89, n. 8, p.784-796.

PERFECT, S., HUGHES, H., O'CONNELL, R., GREEN, J., 1999. ***Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions**. Fungal Genetics and Biology. 27. 186-198.

PETRI, J.L.; LEITE, G.B.; COUTO, M.; FRANCESCATTI, P. 2011. **Avanços na cultura da macieira no Brasil**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal - SP, Volume Especial, p. 48-56.

PRUSKY D., KEEN N.T., SIMS J.J., MIDLAND S.L. 1982. **Possible involvement of an antifungal diene in the latency of *Colletotrichum gloeosporioides* on unripe avocado fruits.** Phytopathology, v. 72, p. 1578–82.

PRUSKY, D., KOBILER, I., & JACOBY, B. 1988. **Involvement of epicatechin in cultivar susceptibility of avocado fruits to *Colletotrichum gloeosporioides* after harvest.** Phytopathologische Zeitschrift, 123, 140–146.

PRUSKY D., PLUMBLEY, R.A. 1992. **Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and subtropical fruits.** In: BAILEY, J.A.; Ed. *Colletotrichum: biology, pathology and control*. CAB Internacional Wallingford, 289-307.

PRUSKY D., KEEN, N.T. 1993. **Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay.** Plant Disease, v. 77, p. 114–19.

PRUSKY, D., LICHTER, A. 2007. **Activation of quiescent infections by postharvest Pathogens during transition from the biotrophic to the necrotrophic stage.** FEMS Microbiology Letters, 268: 1-8

PRUSKY, D., LICHTER, A., 2008. **Mechanisms modulating fungal attack in post-harvest pathogen interactions and their control.** Eur. J. Plant. Pathol. 121, 281–289.

PRUSKY D., ALKAN N., MENGISTE T., FLUHR R.. 2013 **Quiet and necrotrophic option of post harvest life during the development of the disease.** Review Annual Phytopathology, 51,155-176.

QUIDDE, T., OSBOURN, A., AND TUDZYNSKI, P. 1998. **Detoxification of α -tomatine by *Botrytis cinerea*.** Physiol. Mol. Plant Pathol. 52:151-165.

RESENDE, M.L.V., SALGADO, S.M.L. & CHAVES, Z.M.. 2003. **Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos.** Fitopatologia Brasileira, 28, 123-130.

STADNIK, M.J., ARAÚJO, L., VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. 2009. **Estratégias alternativas de controle da mancha foliar de glomerella e da sarna da macieira** In: STADNIK MJ (Ed.) Manejo integrado de doenças da macieira. Florianópolis, CCA-UFSC, p.105-126.

SWIMBURNE, T.R., 1983 **Quiescent infection in post-harvest diseases**. In: Dennis, C. Ed. **Post-harvest Pathology of fruits and vegetables**, Academic Press, London. 1-21.

TORRES, R., VALENTINES, M. C., USALL, J., VIÑAS, I., & LARRIGAUDIÈRE, C. 2003. **Possible involvement of hydrogen peroxide in the development of resistance mechanisms in ‘Golden Delicious’ apple fruit**. *Postharvest Biology and Technology*, v. 27, p. 235-342.

TORRES, M.A, DANGL, J.L. 2005. **Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development**. *Current Opinion Plant Biology*, .8, 397–403.

TORRES, M. A., JONES, J. D. G., & DANGL, J. L. 2006. **Reactive oxygen species signaling in response to pathogens**. *Plant Physiology*, v. 141, p. 373-378.

VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; BECKER, W.; BONETI, J. I. S.; KATSURAYAMA, Y.; CZERMAINSKI, A. B. C. **Manejo das doenças de verão na produção integrada de maçã**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho,. 12 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 36). 2002.

VALENTINES, M.C., VILAPLANA, R., TORRES R., USALL J., LARRIGAUDIÈRE C.. 2005. **Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance**. *Postharvest Biology Technology*, 36, 227–234

VELHO A.C., ALANIZ S., CASANOVA L., MONDINO P., STADNIK M. J., 2015. **New insights into the characterization of Colletotrichum species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay**. *Fungal Biology*, 119, 4, 229-244.

VELHO A.C., ROCKENBACH, M. F., MONDINO P., STADNIK M. J., 2016. **Modulation of oxidative responses by a virulent isolate of *Colletotrichum fructicola* in apple leaves**, Fungal Biology. Available online 9 July 2016.

VERHOEFF, K., AND LIEM, J. 1975. **Toxicity of tomatine to *Botrytis cinerea*, in relation to latency**. Phytopathol. Z. 82:333-338.

VILANOVA LA., TEIXIDÓ N., TORRES R., USALL J., VIÑAS I. 2012a. **The infection capacity of *P. expansum* and *P. digitatum* on apples and histochemical analysis of host response**. International Journal Food Microbiology, 157, 360–367

VILANOVA LB., VIÑAS R., TORRES R., TEIXIDÓ N. 2012b. **Infection capacities in the orange-pathogen relationship: Compatible (*Penicillium digitatum*) and incompatible (*Penicillium expansum*) interactions**. Food Microbiology, 29, 56–66.

WEIR, B., JOHNSTON, P.R., DAMM, U. 2012. **The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex**. Studies in Mycology, v.73, p.115–180,

WHARTON, P.S., DIÉGUEZ-URIBEONDO, J., 2004. **The biology or *Colletotrichum acutatum***. Annual Jardín Botany. Madrid. 61, 3-22.

WOOD, R. K. S. 2012. **Active defense mechanisms in plants**. NATO Advanced study institutes series. Series A, Life Sciences.

YERHOEFF K. 1974. **Latent infections by fungi**. Phytopathology., 12: 99-110.

4 CAPÍTULO 2 – PROCESSO INFECCIOSO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum fructicola* EM FRUTOS DE MAÇÃ EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO A CAMPO E EM PÓS-COLHEITA.

4.1 RESUMO

A mancha foliar de *Glomerella* (MFG) e a Podridão Amarga (PA) são causadas por espécies de *Colletotrichum* e consideradas importantes doenças de verão na cultura da macieira, ocasionando lesões em folhas e frutos em campo ou pós-colheita, respectivamente. Informações sobre o processo infeccioso de isolados de *Colletotrichum fructicola* provenientes de folhas com MFG ou frutos com PA são raros na literatura. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de isolados de *C. fructicola* provenientes de diferentes tecidos de macieira causarem sintomas de podridão amarga em frutos com diferentes estágios de desenvolvimento a nível de campo e pós-colheita. Foram utilizados isolados previamente identificados por ocasionar MFG em folhas (MANE 147) e PA em frutos (MANE 41). Frutos foram inoculados em três estágios de desenvolvimento (J1, J2 e J3) durante as safras de 2013/2014, 2014/2015 e 2015/2016 e foi avaliada a incidência de frutos doentes. Quando maduros, os frutos foram colhidos e levados à câmara fria para a determinação de infecções quiescentes na fase de pós-colheita. Frutos inoculados a campo com o isolado MANE 147 (proveniente de MFG) apresentaram lesões pequenas marrons com aproximadamente 6 mm de diâmetro durante o estágio J1 na safra de 2013/2014 e estágio J1 e J3 na safra de 2015/2016. Somente frutos inoculados no estágio J1 com o isolado MANE 41 apresentaram lesões pequenas marrons, mas com baixa incidência da doença na safra de 2013/2014. Lesões em frutos inoculados com o isolado MANE 147, na safra de 2013/2014, não evoluíram para PA na fase de pós-colheita. Em contraste, frutos dos três estágios de desenvolvimento inoculados com o isolado MANE 41 na safra de 2013/2014 apresentaram PA fase de pós-colheita. Frutos inoculados com os dois isolados de *C. fructicola* nas safras de 2014/2015 e 2015/2016 apresentaram lesões de PA na fase de pós-colheita. Desta forma os resultados do presente estudo sugerem que os dois isolados de *C. fructicola* (provenientes de folha ou fruto) possuem

capacidade de causar pequenas lesões marrons em frutos a nível de campo as quais podem evoluir para PA na fase de pós-colheita.

4.2 INTRODUÇÃO

A maçã é a terceira fruta mais consumida no mundo (FAO, 2013). No Brasil, o cultivo de maçãs concentra-se na região serrana dos estados do sul do país, onde as condições ambientais favorecem o seu estabelecimento. No entanto, esses estados apresentam também as condições climáticas ideais para o desenvolvimento de muitas doenças. Dentre as principais doenças destaca-se a a mancha foliar de *Glomerella* (MFG), causada por espécies do gênero *Colletotrichum*, que pode causar intenso desfolhamento em plantas da cultivar Gala (*Malus domestica*) em condições de alta umidade (SUTTON et al., 1992; GONZALEZ et al., 2006; KATSURAYAMA E BONETTI 2009).

Folhas sintomáticas apresentam inicialmente manchas de coloração avermelhadas que evoluem para manchas necróticas de cor palha. A MFG pode causar uma desfolha prematura em folhas com severidade maior que 30% (HAMADA, 2013). Nos frutos, os sintomas se caracterizam pela presença de pequenas lesões (1 a 3 mm) deprimidas de cor marrom-avermelhadas. Geralmente, relata-se que lesões de MFG em frutos não evoluem para podridão amarga (PA). No entanto, não existem estudos conclusivos sobre a evolução de sintomas típicos da MFG e sua relação com a PA em frutas maduras (BECKER et al., 2000; VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002; VELHO et al., 2015).

Segundo Prusky et al. (2013), pequenas lesões podem não evoluir para podridões e ficar como infecções quiescentes do fungo. Esta é uma característica de alguns fungos hemibiotróficos, como *Colletotrichum*. Durante o processo de ataque, o patógeno ao entrar em contato com o tecido da planta, fica aderido ou quebra a cutícula do fruto verde e permanece inativo por vários meses até o fruto amadurecer. Uma vez que o fruto amadurece, o fungo coloniza os tecidos e ocasiona a podridão.

Dentre as podridões em frutos de maçã, a PA é considerada uma das mais amplamente distribuídas no mundo, apresentando perdas de até 50% na pré-colheita e pós-colheita. As lesões características são deprimidas de 0,5 a 6 cm de diâmetro, circulares, concêntricas e de

coloração parda a escura, provocadas por diferentes espécies de *Colletotrichum*. No centro da lesão, é comum a ocorrência de acérvulos com intensa esporulação salmão ou escura. Geralmente as lesões na parte interna do fruto adquirem um formato de V da cutícula ao centro (SUTTON, 1992).

Recentemente foram identificadas as principais espécies que são causadoras de MFG e PA no sul do Brasil. Dentre essas, *C. fructicola* foi observada em 79% dos pomares avaliados, como a principal espécie causadora destas duas doenças (VELHO et al., 2015). Não existem estudos que determinam o estágio fenológico de maior suscetibilidade para infecção por *C. fructicola* em frutos de maçã. Em pêra (*Pyrus bretschneideri* Rehd. var. 'Suli'), foi observado que isolados de *C. fructicola* tem ocasionado manchas pretas em frutos imaturos e que essas manchas são um estado inicial da PA observada em frutos maduros (JIANG et al., 2014).

No Brasil a MFG e a PA vêm sendo tratadas como doenças distintas, a partir de relatos originados de observações visuais que afirmam que as pequenas lesões causadas pelos isolados de MFG em campo não evoluem para PA na pós-colheita. Além disso, não existem estudos que determinam o estágio de desenvolvimento do fruto mais suscetível para a infecção por *C. fructicola* e desenvolvimento da doença em nível de campo e pós-colheita. Desta maneira, o objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de isolados de *C. fructicola* provenientes de diferentes tecidos de macieira provocar sintomas de PA ou pequenas lesões marrons em frutos de maçã de diferentes estágios de desenvolvimento a nível de campo e pós-colheita

4.3 METODOLOGIA

4.3.1 Experimento a campo

Os experimentos foram conduzidos na Estação Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), localizada no município de São Joaquim, SC (28°17'39"S, 49°55'56"W, a 1.415 m de altitude), entre 2013 e 2016. O clima, segundo a classificação de Köppen-Geiger, é do tipo Cfb, mesotérmico úmido, sem estação seca e com verão fresco (BENEZ, 2005). O

acúmulo médio de temperaturas iguais ou inferiores a 7,2°C na região é de 900 horas. O solo da área experimental é classificado como Cambissolo Húmico, de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SANTOS et al., 2013). Foram utilizadas plantas com 16 anos de idade da cultivar Gala enxertadas sobre porta-enxerto Marubakaido (*Malus prunifolia*), utilizando um espaçamento de 4,5 x 2,0 m. Os experimentos foram realizados durante três safras: nos períodos de novembro de 2013 a fevereiro de 2014, novembro de 2014 a fevereiro de 2015 e novembro de 2015 a fevereiro de 2016.

Os dados meteorológicos da estação Experimental de São Joaquim foram fornecidos pelo Centro de Informações de Recursos Ambientais e de Hidrometeorologia e Santa Catarina (EPAGRI/CIRAM). A partir de dados meteorológicos mensais de precipitação, umidade relativa e temperatura, foi calculado o número de dias favoráveis (DF) à ocorrência da MFG. Katsurayama et al. (2000) definem 1 DF como o período de molhamento foliar (PMF) acima de 10 horas, temperatura acima de 15°C e umidade relativa acima de 87%.

4.3.2 Inoculação

Para as inoculações foram utilizados os isolados MANE 147, que causa sintomas típicos de MFG, proveniente de folhas de macieira de um pomar localizado na cidade de Urubici/SC; e o isolado MANE 41, que causa sintomas característicos de PA, oriundo de frutos de maçã de um pomar localizado na cidade de Fraiburgo/SC. Estes isolados foram identificados previamente por Velho et al. (2015), como *C. fructicola*. Os isolados foram mantidos em placas de Petri com 9 cm de diâmetro com meio de cultura de batata dextrose agar (BDA) a 25°C por 10 dias. Após esse período, as colônias foram raspadas superficialmente com alça de Drigalsky e a concentração da suspensão foi ajustada para 1×10^6 conídios.mL⁻¹ de *C. fructicola* com o auxílio de hemacitômetro.

Os frutos de diferentes estágios de desenvolvimento foram previamente identificados com uma fita de polietileno colorida e inoculados em momentos distintos no campo, de acordo com a tabela 1. Os distintos estágios de maturação dos frutos foram nomeados de J1, J2 e J3 segundo a metodologia adotada por Gautier (1988) onde J corresponde a frutos imaturos (tabela 2.1). Os frutos foram pulverizados com uma suspensão de conídios ($1 \pm 0,5$ mL) com auxílio de

pulverizador manual (capacidade 500 mL, vazão 50 mL/min). Nas inoculações a campo não foram realizados fermentos nos frutos. Após a inoculação, os frutos foram envolvidos com um saco transparente de polietileno por um período de 48 horas. Posteriormente, os sacos foram retirados e foi avaliado o período de incubação nos frutos a cada dois dias até o aparecimento de sintomas de MFG e PA nos frutos.

Para a determinação de infecções quiescentes, frutos inoculados nos três estágios de desenvolvimento (J1, J2 e J3) foram colhidos em um mesmo momento, ou seja, quando todos estavam maduros. Esses frutos foram acondicionados em caixas de papel e transportados para o laboratório de fitopatologia. Então, os frutos foram desinfetados em solução de hipoclorito a 0,5% por 2 minutos, lavados com água corrente e secos ao ar livre. Em seguida, foram transportados e conservados em uma câmara fria (4°C), localizada no Laboratório de Tecnologia de Leite e Derivados do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da mesma Universidade por um período de seis meses para avaliação da PA na fase de pós-colheita.

Tabela 2.1. Características dos estágios de desenvolvimento dos frutos de maçã da cultivar Gala e datas de inoculação de *Colletotrichum fructicola* durante os experimentos a campo.

Características dos frutos			
	Estágios		
	J1 (Fruto verde)	J2(Fruto intermediário)	J3 (Fruto início da maturação)
Dias após a queda das pétalas	30±7	55±5	70±6
Diâmetro (mm)	28±4	44±5	60±5
Peso (g)	25±6	54±8	120±15
Datas de inoculação dos frutos			
Safras	1º (Estagio J1)	2º (Estagio J2)	3º (Estagio J3)
2013/2014	19/11/2013	11/12/2013	08/01/2014
2014/2015	25/11/2014	18/12/2014	-----
2015/2016	10/11/2015	16/12/2015	12/01/2016

Linha pontilhada indica que a inoculação não foi realizada nessa data

4.3.3 Processo infeccioso de *Colletotrichum fructicola* em frutos de maçã

Para examinar os aspectos histopatológicos do processo infeccioso de *C. fructicola*, discos da casca de frutos no estagio J1 (fruto verde), foram coletados com auxílio de um furador metálico (8 mm de diâmetro e 5 mm de profundidade) aos 14 dias após a inoculação (DAI). Discos coletados a partir de frutos não inoculados serviram como controle. Foram coletados quatro discos de seis frutos de cada tratamento e constituído um pool de 24 discos como uma única amostra para cada tratamento. Os discos foram fixados em solução Karnovsky modificada contendo paraformaldeído 4% e tampão fosfato 0,2 M (v/v) e submetidos a uma bomba de vácuo para remoção do ar dos tecidos durante 24 horas a 4°C. Desses 24 discos foram escolhidos aleatoriamente três discos para o processamento das amostras. As amostras foram lavadas duas vezes em tampão fosfato 0,1 M. Em seguida, passaram por desidratação em série etílica (30, 50, 70, 90 e 100%) permanecendo durante 30 minutos em cada etapa. Após a desidratação, os tecidos foram infiltrados com historesina (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha).

Os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo Leica RM 2135 e secções seriadas transversais (5µm de espessura) foram corados com azul de toluidina a 0,5% (Merck Darmstadt, Alemanha) para polissacarídeos ácidos por meio de reação metacromática. Cada lâmina avaliada apresentava 36 fragmentos de tecido de frutos de maçã. Cada secção foi observada em microscópio Olympus BX 41 equipado com captura de imagem Q Pro 5.1 software (Qimaing Corporation, Austin, TX, USA) (SCHMIDT et al., 2009). Para obtenção de imagens de microscopia de fluorescência foi utilizado um microscópio de luz invertido IX-81 Olympus (modelo U-LH100HG, 19 V 100W) equipado com sistema de fluorescência U-RFL-T (Tóquio, Japão), câmera Olympus DP71 modelo U-TV0.5XC-3 (Tóquio, Japão), associada a software cellSens 1.7 (Olympus). Foram utilizados os seguintes conjuntos de filtros de Luz UV (excitação de 340 a 380 nm com filtro de barreira de 430 nm) ou luz azul (excitação de 450 a 490 nm com filtro de barreira de 515 nm).

4.3.4 Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos sob delineamento em blocos completamente casualizados com cinco repetições, com esquema fatorial 3 x 2 sendo um fator os frutos em diferentes estágios de desenvolvimento (J1, J2 e J3) e o outro fator os isolados de *C. fructicola* (MANE 41 e 147). Cada unidade experimental foi formada por três árvores distribuídas aleatoriamente dentro do bloco. Para a avaliação da incidência de lesões foram selecionados ao acaso 10 frutos/planta/tratamento para cada unidade experimental totalizando 150 frutos analisados por tratamento. Para avaliação de infecções quiescentes foram avaliados 568, 773 e 480 frutos durante as safras de 2013/2014, 2014/2015 e 2015/2016, respectivamente.

Os dados foram submetidos a análises de variância (ANOVA) para determinar as diferenças significativas. Para a separação de médias foi usado o teste Tukey ($p \leq 0,05$). A análise estatística foi realizada utilizando o software Statística 8.0 (STATSOFT, 2007).

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Incidência de frutos com lesões a campo

O isolado MANE 147 de *C. fructicola* ocasionou uma grande quantidade de pequenas lesões marrons nos frutos inoculados no estágio J1 na safra de 2013/2014 (Figura 2.1A) e no estágio J1 e J3 na safra 2015/2016 (Figura 2.1C e D). Essas pequenas lesões aprofundadas de coloração marrom-avermelhadas e com diâmetro entre 1 e 6 mm iniciaram-se aos 5 ± 1 dias após a inoculação (Figura 2.1D1).

Na safra 2013/2014, 87% dos frutos avaliados apresentaram pequenas lesões marrons quando inoculados com o isolado MANE 147 no estágio J1 (Figura 2.1A; Tabela 2.2). Frutos inoculados no estágio J1 com o isolado MANE 41 apresentaram poucas lesões (todas pequenas) em apenas 2% dos frutos (Figura 2.1B; Tabela 2.2). Na safra 2013/2014 não foram observadas lesões nos frutos quando estes foram inoculados nos estágios J2 e J3, independente do isolado de *C. fructicola* utilizado (Tabela 2.2).

Na safra 2014/2015 não foram observados sintomas típicos da MFG ou PA em frutos de qualquer estagio e inoculados com os dois isolados de *C. fructicola* (Dados não mostrados).

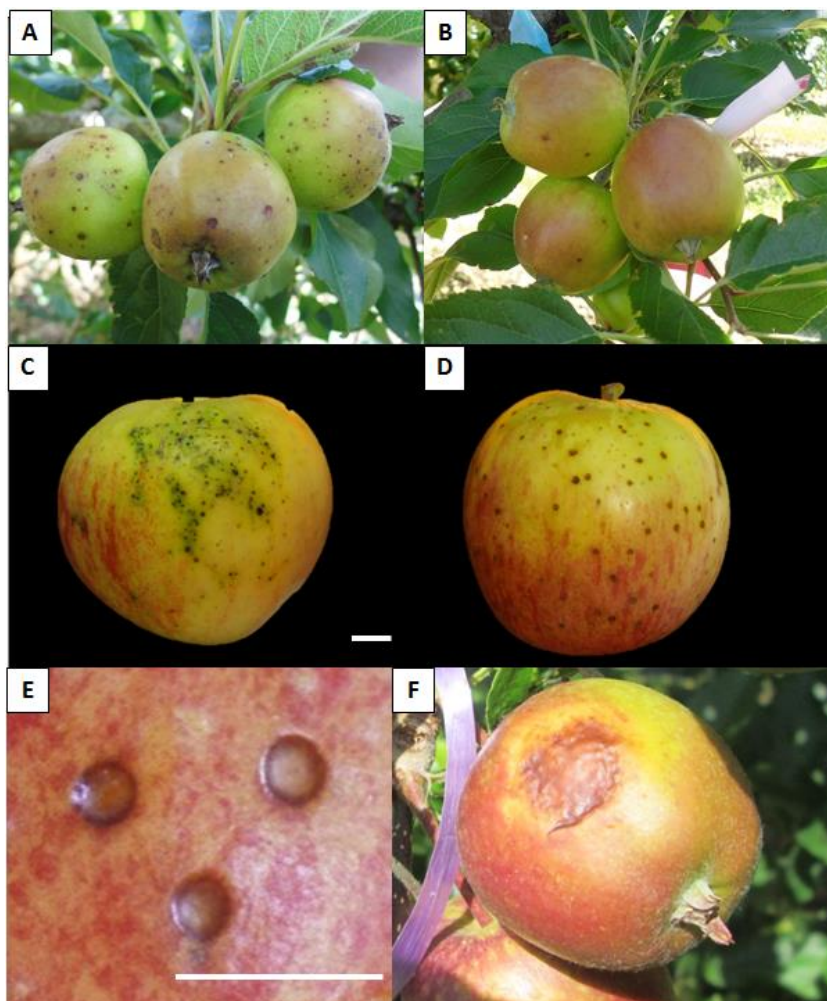
Na safra 2015/2016, frutos inoculados no estágio J1 com o isolado MANE 147 apresentaram diversas pequenas lesões marrons em 62% dos frutos avaliados (Tabela 2.2). Frutos infectados no estágio J3 apresentaram pequenas lesões e com coloração marrom clara e aprofundada em 43% dos frutos avaliados (Figura 2.1D; Tabela 2.2). Três frutos desenvolveram sintomas de PA ainda no campo quando inoculados com o isolado MANE 147 em frutos do estágio J1 (Figura 2.1F). Frutos inoculados com o isolado MANE 41 mostravam poucas pequenas lesões somente quando foram infectados no estágio J1 e este padrão foi observado somente em 1% dos frutos avaliados (Tabela 2.2).

Tabela 2.2. Incidência de frutos de maçã da cultivar Gala com lesões necróticas de coloração marrom, inoculados a campo com dois isolados de *Colletotrichum fructicola*. Avaliação realizada aos 20 dias após a inoculação.

Estágio	Safras			
	2013/2014		2015/2016	
	Isolados		Isolados	
	MANE147	MANE41	MANE 147	MANE 41
J1	86,6% Aa	2% Ab	62% Aa	1,3% Ab
J2	0% Ba	0% Aa	0% Ca	0% Aa
J3	0% Ba	0% Aa	42,6% Ba	0% Ab

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas na linha não diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$) como determinado pelo teste Tukey.

Figura 2.1. Frutos de maçã (*Malus domestica*) cultivar Gala inoculados no estágio J1 (Fruto verde), com o isolado MANE 147 de *Colletotrichum fructicola* apresentando várias pequenas lesões marrons (A) ou com o isolado MANE 41, com poucas pequenas lesões durante a safra 2013/2014 (B) aos 22 dias após a inoculação. Frutos maduros (C) com pequenas lesões quando inoculados em campo com o isolado MANE 147 no estágio J1 aos 101 dias após a inoculação e (D) frutos inoculados no estágio J3 (Fruto no início da maturação) aos 38 dias após a inoculação na safra de 2015/2016 apresentando (E) pequenas lesões marrons aprofundadas. (F) Fruto inoculado no estágio J1 (Fruto verde) com o isolado MANE 147 de *Colletotrichum fructicola* apresentando podridão amarga (PA) aos 14 dias após a inoculação na safra de 2015/2016. Barra indica 1cm para figura C e D. Barra indica 0,5 cm para E.



Fonte: Autor

4.4.2 Informações climáticas

Durante a safra de 2013/2014, quando foi realizada a primeira inoculação as temperaturas foram em média 17,7°C, com 10 mm de precipitação durante os primeiros dias após a inoculação. Na segunda inoculação, a temperatura média foi de 13,8°C e sem precipitação, e na terceira inoculação a temperatura média foi de 20°C com 5,9 mm de precipitação (Figura 2.2A).

Na safra de 2014/2015, quando foi realizada a primeira inoculação, a temperatura média foi de 13,4 com 16 mm de precipitação durante os primeiros dias após a inoculação. Na segunda inoculação a temperatura foi de 17,6 com 16 mm de chuva (Figura 2.2B).

Durante a safra de 2015/2016 para a primeira inoculação a temperatura foi de 17,8°C e 19 mm de precipitação, enquanto que na segunda e terceira inoculações as temperaturas médias foram de 17,7 e 19,4 respectivamente sem ocorrência de precipitações (Figura 2.2C).

O número de dias favoráveis (DF) à ocorrência da MFG no período dos experimentos durante a safra de 2013/2014 durante a primeira inoculação no mês de novembro foi de 6 DF, em dezembro 3 e no mês de janeiro 5 (Tabela 2.3). Na safra de 2014/2015 no mês de novembro 1 DF, dezembro 7 DF (Tabela 2.3). Na safra de 2015/2016 de sete DF para MFG no mês de novembro, 10 nos meses de dezembro e janeiro (Tabela 2.3).

Tabela 2.3. Dados meteorológicos mensais de precipitação, umidade relativa (UR%), temperatura (°C), número de dias favoráveis (DF) à ocorrência da mancha foliar de *Glomerella*, registrados durante os experimentos nas safras de 2013/2014, 2014/2015 e 2015/2016 na Estação experimental da Epagri, localizada no município de São Joaquim, SC.

Safr	Mês	Precipitação			Temperatura (°C)			UR (%)	DF ⁴
		Pa ¹ (mm)	DC ²	DC ³	Mín	Máx	Média		
2013/ 2014	Novembro	122	11	3	10	21	15,4	78	6
	Dezembro	156	14	3	13	23	18,1	76	3
	Janeiro	136	18	10	15	25	19,7	74	5
	Fevereiro	261	17	6	15	24	19,6	73	4
2014/ 2015	Novembro	139	11	7	11	21	16	76	1
	Dezembro	252	15	6	14	22	18	78	7
	Janeiro	243	25	15	13	24	18,6	81	11
	Fevereiro	151	20	13	15	23	18,7	83	5
2015/ 2016	Novembro	123	18	5	11	20	15,3	82	7
	Dezembro	212	19	8	14	22	18	82	10
	Janeiro	120	10	3	13	23	18,4	80	10
	Fevereiro	178	20	9	14	23	19	83	11

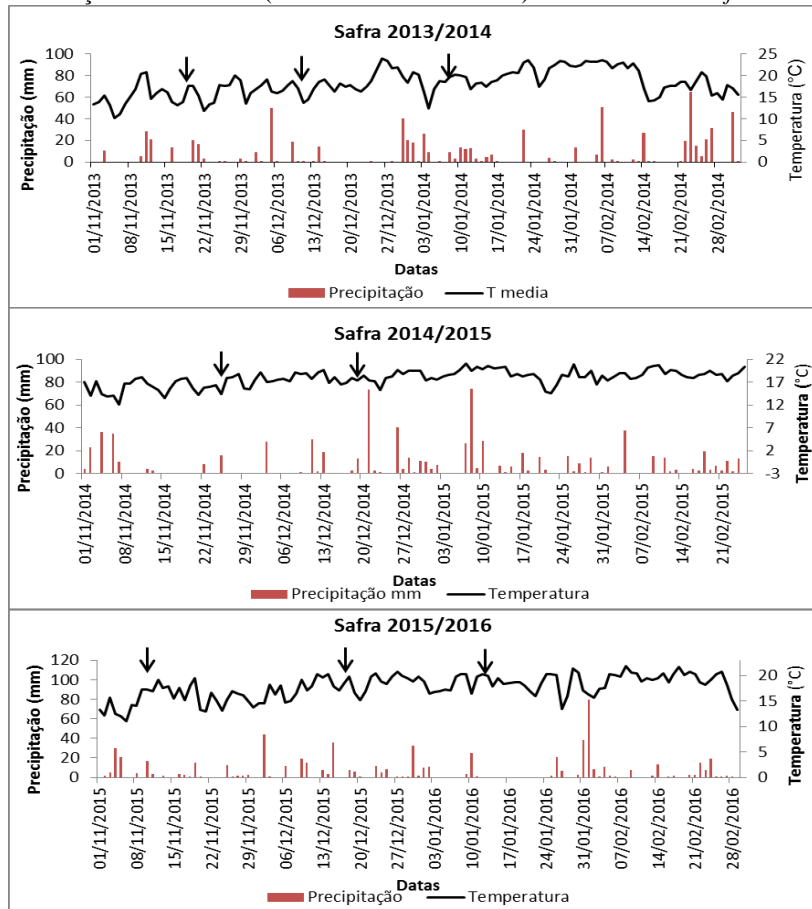
¹Pa: precipitação acumulada

²DC: número de dias com chuva

³DCC: número máximo de dias consecutivos com chuva

⁴DF: número de dias favoráveis a ocorrência de MFG (foi considera como dias favoráveis quando a temperatura média foi maior a 15°C e a umidade relativa do ar superior a 87%)

Figura 2.2. Precipitação (mm) e temperatura média (°C) na estação experimental da Epagri, localizada no município de São Joaquim –SC. Dados diários dos anos 2013/2014 (novembro a fevereiro), 2014/2015 (novembro a fevereiro) e 2015/2016 (novembro a fevereiro). Setas indicam dias de inoculação com isolados (MANE 41 e MANE 147) de *Colletotrichum fructicola*



Fonte: Autor

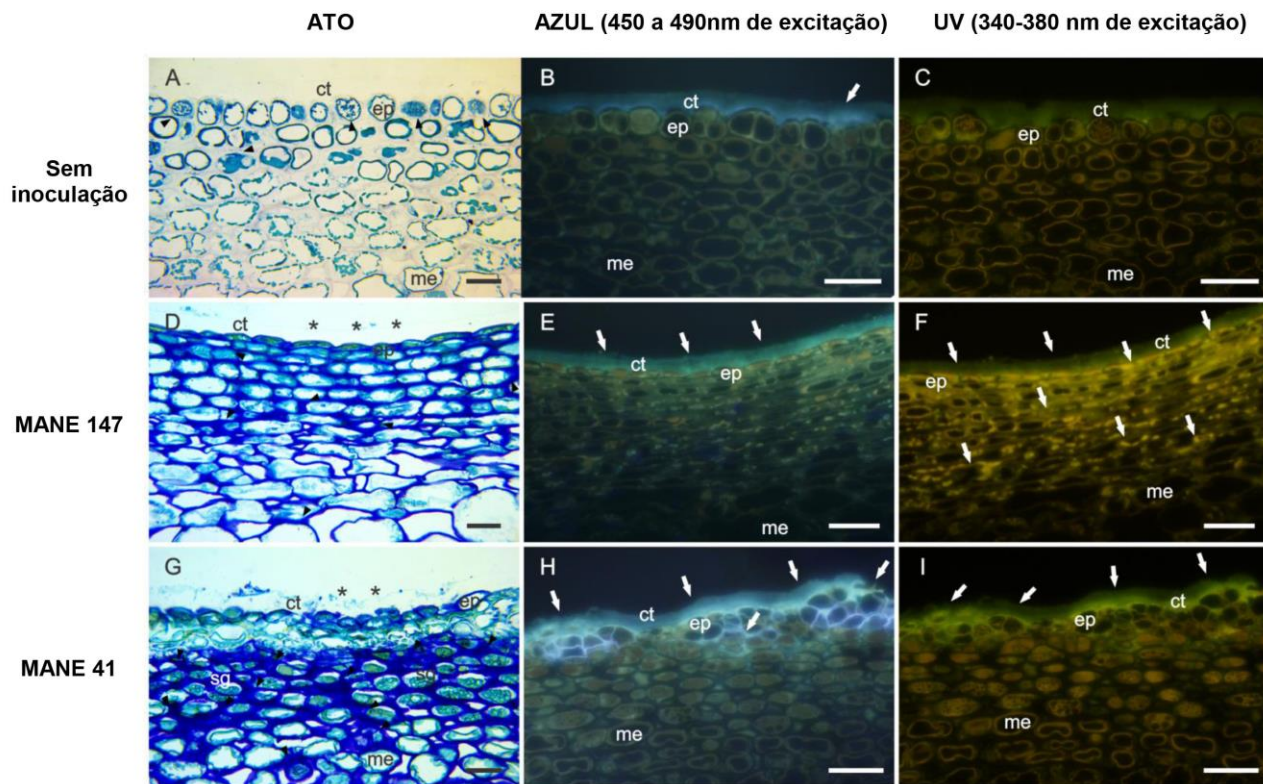
4.4.3 Processo infeccioso de *C. fruticola* em frutos de maçã

Tecidos de frutos sadios de maçã durante o estagio J1 apresentavam cutícula íntegra que apresentava fraca autofluorescência (Figura 2.3A, B, C). Abaixo da cutícula foram observadas células epidérmicas seguidas das células do mesocarpo sem qualquer sinal de destruição celular (Figura 2.3A, B, C).

Os tecidos dos frutos aos 14 DAI com o isolado MANE 147 apresentam uma leve depressão na cutícula e na camada das células epidérmicas, estas células apresentavam-se levemente achatadas (Figura 2.3D E, F). Ambas, cutícula, células epidérmicas e do mesocarpo mostravam acúmulo de compostos fenólicos e forte autofluorescência em comparação aos tecidos sadios (Figura 2.3 D, E, F). Não foi possível observar estruturas fúngica nos tecidos.

Tecidos dos frutos inoculados com o isolado MANE 41 apresentam deformação da cutícula e das células epidérmicas com uma aparente multiplicação celular em resposta à infecção de *C. fruticola* (Figura 2.3G, H, I). Foi observado forte acúmulo de compostos fenólicos nas células epidérmicas com muito forte autofluorescência nestas células (Figura 2.3H, I). Além disso, foi detectado autofluorescência especialmente na região da cutícula (Figura 2.3H, I) de frutos inoculados com o isolado MANE 41 em comparação a frutos sadios (Figura 2.3B, C) e inoculados com o isolado MANE 147 (Figura 2.3E, F). Não foi possível observar estruturas fúngica nos tecidos.

Figura 2.3. Micrografias de luz (A, D, G) e correspondente fluorescência (B, C, E, F, H, I) de seções transversais do tecido de frutos de maçã no estagio J1 (fruto verde). (A, B, C) Tecidos de frutos de maçã não inoculados (controle). Tecidos de frutos de maçã aos 14 dias após a inoculação com os isolados MANE 147 (D, E, F) e MANE 41 (G, H, I) de *Colletotrichum fruticola*. (A, D, G) Algumas células reagiram à infecção fúngica pelo acúmulo de compostos fenólicos (cabeças de seta). Autofluorescência (setas) em tecidos de frutos de maçã quando utilizado filtro azul (395 a 400nm de excitação; B, E, H) e UV (365 nm excitação; C, F, I). Asterisco indicam regiões deprimidas no tecido dos frutos. Células epidérmicas (ep), cutícula (ct), grãos de amido (sg), células do mesocarpo (me), Barras 50 µm.



4.4.4 Determinação de infecções quiescentes na fase de pós-colheita

Na safra de 2013/2014, frutos inoculados em campo nos estágios J1, J2 e J3 com o isolado MANE 41 apresentaram 5%, 17% e 9% respectivamente, de incidência de frutos com sintomas de PA após armazenamento de seis meses em câmara fria (Tabela 2.4). Foi observada a presença de várias lesões por fruto com diâmetro de 15 a 58 mm de diâmetro (Figura 2.4). Nesta mesma safra, frutos inoculados em campo no estágio J1 com o isolado MANE 147 apresentavam 7% dos frutos avaliados com pequenas lesões avermelhadas que não evoluíram para PA (Tabela 2.4; Figura 2.4).

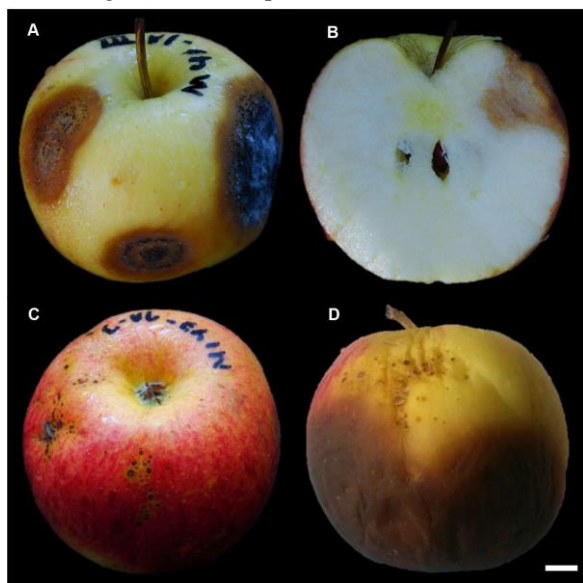
Tabela 2.4. Incidência de frutos de maçã cultivar Gala com pequenas lesões marrons ou com podridão amarga na fase de pós-colheita aos seis meses após a conservação em câmara fria. Os frutos foram inoculados em campo com isolados de *Colletotrichum fructicola* em três estágios de desenvolvimento (J1: fruto verde; J2: fruto intermediário; J3: fruto no início da maturação).

Safra						
Estágios	2013/2014		2014/2015		2015/2016	
	Isolados					
	MANE 147	MANE 41	MANE 147	MANE 41	MANE 147	MANE 41
Incidência (%) de frutos com pequenas lesões *						
J1	7Aa	0Ab	11Aa	0Ab	28Aa	7 Aa
J2	0Ba	0Aa	9Aa	0Ab	9 Aa	8 Aa
J3	0Ba	0Aa	--	--	22 Aa	9 Aa
Média	2,33	0	10	0	19,6	7,8
Incidência (%) de frutos com podridão amarga						
J1	0Aa	5Aa	0Ab	26Aa	26Aa	24Aa
J2	0Aa	17Ab	10Ab	27Aa	14Aa	17Aa
J3	0Aa	9Ab	--	--	30Aa	23Aa
Média	0	10,3	5	26,5	23,3	21,3

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna ou letras minúsculas na linha não diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$) como determinado pelo teste Tukey.

Na safra de 2014/2015, 26% e 27% dos frutos levados a câmara fria inoculados a campo com o isolado MANE 41 durante o estágio J1 e J2 respectivamente apresentaram sintomas da PA (Tabela 2.4). Muitas lesões apresentavam alta esporulação no centro da podridão e algumas abrangeram toda a extensão dos frutos (Figura 2.4A). Nesta safra, os frutos inoculados a campo com o isolado MANE 147 tinham como característica principal a presença de lesões pequenas e avermelhadas levemente profundas (Figura 2.4C). Frutos inoculados nos estágios J1 e J2 exibiam 11% e 9% de incidência de pequenas lesões, respectivamente (Tabela 2.4). Frutos inoculados no estágio J2 apresentaram 10% de incidência de PA com lesões de até 20 mm e esporulação no centro da podridão (Tabela 2.4A).

Figura 2.4. Frutos maduros de maçã cultivar Gala com sintomas de podridão amarga após seis meses de armazenagem em câmara fria. (A e B) Frutos aos 234 dias após a inoculação com isolado MANE 41 de *Colletotrichum fructicola* durante o estágio J3. (A) Lesão aprofundada com alta esporulação no centro da podridão. (B) Parte interna do fruto com lesão em formato de V no sentido da cutícula para o centro do fruto. (C e D) Frutos aos 284 dias após a inoculação com o isolado MANE 147 durante o estágio J1, com pequenas lesões marrons (C) e podridão amarga (D). Barra representa 1 cm.



Fonte: Autor

Na safra de 2015/2016 frutos inoculados nos três estágios de desenvolvimento com ambos isolados de *C. fructicola* apresentaram lesões de PA (Tabela 2.4). Não houve diferença significativa para a incidência de PA em frutos inoculados com os isolados MANE 147 e 41 (Tabela 2.4). Frutos dos três estágios de desenvolvimento também exibiam lesões pequenas com até 6 mm de diâmetro (Figura 2.4C e 2.4D). Frutos inoculados com o isolado MANE 147 nos estágios J1, J2 e J3 apresentaram 28, 9 e 22%, respectivamente de incidência de pequenas lesões (Tabela 2.4). Frutos inoculados com o isolado MANE 41 nos estágios J1, J2 e J3 exibiam 7, 8 e 9% respectivamente de incidência de pequenas lesões (Tabela 2.4).

4.5 DISCUSSÃO

O presente trabalho apresenta as primeiras evidências que frutos de maçã em diferentes estágios de desenvolvimento podem ser infectados no campo por isolados de *C. fructicola* provenientes de folhas e frutos.

Os resultados apresentados mostram que o isolado MANE 147 provocou maior incidência de pequenas lesões marrons quando inoculado a campo em frutos verdes (estágio J1) e em frutos no início da maturação (estágio J3) e, neste estágio, as lesões apresentavam maior diâmetro em relação às observadas durante o estágio J1. No entanto, quando os frutos foram inoculados com o isolado MANE 41, observou-se baixíssima incidência de frutos com pequenas lesões a campo (menor 2%), apenas em frutos no estágio J1.

Frutos verdes foram mais suscetíveis à infecção pelos dois isolados. Frutos intermediários (estágio J2) não apresentaram lesões a campo quando inoculados com ambos isolados de *C. fructicola*. Em contraste, frutos no início da maturação (estágio J3) apresentaram alta suscetibilidade ao isolado MANE 147 de *C. fructicola* e estas lesões apresentavam maior diâmetro em relação às observados nos frutos do estágio J1. Noe et al. (1982) reportaram alta suscetibilidade de frutos de maçã em diferentes estágios de maturação quando inoculados com concentrações superiores a 5×10^4 conídios.mL⁻¹ de *Glomerella cingulata*. Estes resultados indicam que não existe um estágio de desenvolvimento resistente à infecção por *C. fructicola* e que provavelmente o sucesso do processo infeccioso do fungo é influenciado

pelo isolado, concentração de inoculo e condições climáticas. Baseado na incidência de lesões e estágios de desenvolvimento afetados por *C. fructicola*, dos isolados em estudo, o isolado MANE 147 está mais adaptado a provocar doença a nível de campo. Este isolado tem sido relatado em diferentes estudos por ser altamente patogênico em plântulas de macieira da cultivar Gala. Nesses trabalhos, a alta patogenicidade deste isolado foi atribuída ao fato de *C. fructicola* apresentar elevada formação de apressórios na superfície das folhas de maçã de cultivares suscetíveis como a Gala (ARAUJO & STADNIK, 2013 VELHO et al., 2016).

Os sistemas de previsão de doenças existentes no Estado de Santa Catarina (AGROCONNECT - CIRAM) têm alertado sobre os períodos de maior risco à ocorrência da MFG quando as condições apresentam-se ideais para o estabelecimento da doença. De acordo com este sistema de previsão, as condições ambientais que favorecem a infecção de *C. fructicola* são: 1) ocorrência de período chuvoso de três ou mais dias, 2) longo período de molhamento foliar e 3) temperatura durante o molhamento foliar superior a 15°C (KATSURAYAMA et al., 2000). Durante os experimentos, as condições ambientais mais favoráveis ao ataque de *C. fructicola* ocorreram nas safras de 2013/2014 e 2015/2016 que coincidiram com a maior incidência de frutos afetados pelo isolado MANE 147 quando inoculado em frutos nos estágios J1 e J3.

Durante a safra 2015/2016, foi registrada a ocorrência do fenômeno de El niño que provoca um aumento nas temperaturas e nos dias com chuvas. Em São Joaquim, por exemplo, houve um aumento de 3°C na temperatura média em relação à média histórica para esse município. Durante esta safra, foi reportado o aparecimento de MFG precocemente no mês de dezembro nas regiões mais frias e altas, como São Joaquim, e em outubro nas partes mais baixas e quentes (BONETI & KATSURAYAMA, 2016). Neste ano de El niño também ocorreram relatos de campo de que lesões típicas da MFG em frutos cultivar Joaquina evoluíram para PA (ARAUJO et al., 2016).

Em contraste, os menores níveis de doença ocorreram na safra 2014/2015 quando a temperatura média durante a primeira e segunda inoculação não superou os 13°C e 15°C e ocorreram precipitações de 20 e 60 mm, respectivamente. Geralmente em frutos, o período de incubação é maior do que nas folhas, sendo necessário de quatro a seis dias com temperatura em torno de 24°C com algum molhamento ou 12

dias caso as temperaturas estejam menores (DENARDI et al., 2003; KATSURAYAMA & BONETI, 2009). Além disso, outra hipótese que pode explicar os baixos níveis de doença no ciclo 2014/2015 foi o excesso nos volumes de chuva. Os altos volumes de chuva poderiam ter removido os conídios da superfície do fruto e com isso ter interrompido o processo infeccioso do fungo. Caso semelhante foi observado em frutos de manga, onde a baixa incidência de doença foi atribuída a altas precipitações durante a realização dos experimentos (HUERTA-PALACIOS et al., 2009).

O processo infeccioso de *C. fruticola* em frutos verdes de maçã apresenta peculiaridades em relação a outros patossistemas. Várias espécies de fungos têm sido relatadas por possuírem um período de quiescência nos frutos, ou seja, o fungo penetra nas camadas da cutícula ou da epiderme e fica em repouso até o fruto amadurecer. O fungo aguarda sinais para sair do estado de repouso, tais como a produção de etileno, diminuição de compostos antifúngicos e respostas de defesa e mudanças no pH do hospedeiro (ALKAN et al., 2015). Isto foi observado a nível microscópico quando frutos no estágio J1 foram inoculados com o isolado MANE 41 e notou-se uma alta autofluorescência em células epidérmicas provavelmente devido ao acúmulo de compostos fenólicos em resposta à infecção de *C. fruticola*. No presente estudo é muito provável que devido ao alto acúmulo de compostos fenólicos nas células epidérmicas, o isolado MANE 41 não conseguiu invadir as células e ficou em estado de quiescência, esperando as condições necessárias para ser tornar ativo e poder provocar PA no fruto já maduro.

Compostos fenólicos pre-formados têm sido identificados em diferentes patossistemas como em frutos verdes de abacate que foram resistentes a *C. gloeosporioides* devido a uma alta concentração do composto fenólico dieno (1- 1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicososa-12, 15-dieno) (PRUSKY et al., 1991). Em frutos verdes de goiaba, as altas concentrações de tanino foram relacionadas à resistência a *C. gloeosporioides*. Igualmente em frutos verdes de banana, as altas concentrações de taninos inativaram a produção de enzimas extracelulares produzidas pelo fitopatógeno, reduzindo a infecção de *C. gloeosporioides* (SELVARAJ et al., 1999; MORAES et al., 2014; GREENE E MORALES 1967). Os fenólicos são os principais compostos que emitem autofluorescência pela ligação com um anel aromático, o qual está ligado a um ou mais grupos de hidroxilos. Dentre

esses compostos que emitem fluorescência, os principais são a lignina, taninos, flavonoides e antocianinas (DA SILVA FIGUEIREDO et al., 2007).

No presente trabalho, o estado de quiescência ficou bem caracterizado para o isolado MANE 41. Frutos inoculados com esse isolado exibiram baixa incidência de pequenas lesões marrons e não foram observados frutos com PA, a campo. Mas em compensação, o isolado MANE 41 promoveu uma alta incidência e maior agressividade de PA em frutos maduros após o armazenamento. Durante os três experimentos, a incidência de PA no pós-colheita em frutos inoculados com o isolado MANE 41 foi maior quando comparado aos frutos inoculados com o isolado MANE 147 proveniente de MFG. Semelhante a outros isolados que causam PA em frutos, no presente estudo pode-se inferir que o isolado MANE 41 apresenta características de fungos que tem preferencia por fermento ou frutos em estado mais avançado de maturação onde compostos de defesa estão em presentes em baixas quantidades. Comportamento semelhante foi reportado no trabalho de Velho et al. (2015), onde isolados de *C. fruticola* provenientes de frutos com PA necessitaram de fermentos para causar sintomas típicos da doença em frutos da cultivar Pinky Lady. A presença de fermentos em frutos aumenta o sucesso da infecção do fungo já que este fermento pode estimular a quebra do estágio de quiescência, devido ao patógeno não precisar mais usar suas enzimas como cutinases, protease e celulases para penetrar nos tecidos (ALKAN et al., 2014; DENARDI et al., 2003 e LIAO et al. 2012)

Na fase de pós-colheita, depois de armazenamento durante pelo menos seis meses, foi observado que ambos isolados de *C. fruticola* são capazes de ocasionar PA, independente do estágio no qual o fruto havia sido inoculado a campo. As lesões pequenas e marrons observadas em frutos a campo sempre têm sido relatadas como sintomas de MFG em frutos e essas lesões não evoluíam para PA. No presente estudo, frutos inoculados com o isolado MANE 147, em ano apresentando condições muito favoráveis ao patógeno, apresentaram pequenas lesões marrons e, quando maduros e armazenados por seis meses, estas lesões evoluíram para PA. Estas pequenas lesões marrons serviriam como estado de quiescência para a evolução para PA, como também foi observado em frutos de pera (*Pyrus pyrifolia*) quando inoculados com *C. fruticola* (JIANG et al., 2014). Estes resultados indicam que essas lesões podem sim evoluir para PA em pós-colheita, diferente do relatado

por vários pesquisadores (VALDEBENITO SANHUEZA et al., 2002; BONETI et al., 2002; KATSURAYAMA e BONETI, 2009). As pequenas lesões marrons observadas nos frutos inoculados com o isolado proveniente de MFG (MANE 147) também podem servir como possíveis entradas para outros patógenos causadores de podridões como *Penicillium expansum* e *Botrytis cinérea*, como observado no presente trabalho.

Os resultados do presente estudo demonstram que os dois isolados de *C. fruticola* apresentam estratégias diferentes durante a interação com o hospedeiro. O isolado MANE 147 parece possuir maior evolução no parasitismo, conseguindo infectar eficientemente folhas (ARAUJO & STADINIK 2013; VELHO et al., 2015;2016) e frutos verdes, enquanto a colonização em frutos predomine em tecidos clorofilados. Em contraste, o isolado MANE 41 apresenta-se mais agressivo, promovendo intensa colonização dos tecidos em frutos maduros, provocando consequentemente maior incidência de frutos com PA em pós-colheita.

O entendimento das interações de isolados de *C. fruticola* em frutos de maçã de diferentes estágios de desenvolvimento em nível de campo e pós-colheita são muito importantes para o estabelecimento de medidas de controle eficientes. A partir dos dados obtidos no presente trabalho foi possível observar que frutos verdes são mais suscetíveis a isolados provenientes de folhas com MFG. Desta maneira é muito importante a proteção destes frutos desde a queda de pétalas até estágios mais avançados de maturação. Além disso, deve ser evitado ao máximo ferimentos nos frutos, pois no estágio de pós-colheita estes podem servir como abertura para novas infecções.

Sugere-se, também, que a MFG e PA poderiam vir a ser tratadas como antracnose da macieira, já que estas se apresentam como uma mesma doença de acordo com os dados do presente estudo. A sintomatologia de *C. fruticola* na macieira é diferenciada devido aos isolados, pressão de inóculo, condições climáticas e estágio de desenvolvimento do fruto no qual ocorre a infecção. Embora estes fatores possam influenciar nos sintomas, isto não justificaria a existência de dois nomes para uma doença causada por um mesmo agente causal, exemplo do que já ocorre para outros patossistemas envolvendo *Colletotrichum*, como a antracnose da manga (ARAUZ, 2000) e do morango (PERES et al., 2005).

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKAN, N., FRIEDLANDER, G., MENT, D., PRUSKY, D., FLUHR, R. 2015. **Simultaneous transcriptome analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* and tomato fruit pathosystem reveals novel fungal pathogenicity and fruit defense strategies.** New Phytologist , 205: 801–815

ARAÚJO, L., & STADNIK, M. J. 2013. **Múltiplos apressórios e tubos de anastomoses conidiais no processo infeccioso de *Colletotrichum gloeosporioides* em macieira.** Bragantia, 72(2), 180–183.

ARAUZ, L. F. 2000. Mango Anthracnose: Economic Impact and Current Options For Integrated Managaement. Plant disease, 84(6), 600-611.

BECKER, W.F.; KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I.S. **Mancha foliar da gala: principal doença de verão da cultura da macieira.** Agropecuária Catarinense, v. 13, p. 14-20, 2000.

BENEZ, M.C. 2005. **Dados e informações biofísicas da Unidade de Planejamento Regional Planalto Sul Catarinense - UPR 3.** In: DUFLOTH, J.H.; CORTINA, N.; VEIGA, M.; MIOR, L.C. (Ed.). Estudos básicos regionais de Santa Catarina. Florianópolis: Epagri, 76p.

BONETI JI DA S, KATSURAYAMA Y, BLEICHER J. 2002. **Doenças da macieira.** In: EPAGRI (Ed.) A Cultura da Macieira. Florianópolis, Epagri, pp. 527-593.

BONETI, J.I. & KATSURAYAMA, Y. 2016. **Doenças influenciaram na produtividade e qualidade da fruta.** Informativo da Associação de Produtores de Maçã e Pera de Santa Catarina (AMAP). v. 1 p. 4.

DA SILVA FIGUEIREDO, A. C., BARROSO, J. M. G., PEDRO, L. M. G., & ASCENSÃO, L. 2007. Histoquímica e Citoquímica em Plantas: . Princípios e Protocolos. Cell. Res, 11, 640-643.

DENARDI, F.; BERTON, O.; SPENGLER, M.M. 2003. **Resistência genética à podridão-amarga em maçãs, determinada pela taxa de**

desenvolvimento da doença em frutos com e sem fermentos. Revista Brasileira de Fruticultura, v.25, p.494-497.

GAUTIER M. **Les productions fruitières.** Paris, Lavoisier, 1988. 480 p.

GONÇALVES, A.E., VELHO, A.C. & STADNIK, M.J. 2016. **Formation of conidial anastomosis tubes and melanization of appressoria are antagonistic processes in *Colletotrichum* spp. from apple.** European Journal of Plant Pathology. In press.

GONZALEZ, E., SUTTON, T.B., CORREL, J.C. 2006. **Clarification of the etiology of Glomerella leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular, and pathogenicity tests.** Phytopathology.96:982-992.

GREENE GL, MORALES C. 1967. **Tannins as the cause of latency in anthracnose infections of tropical fruit.** Turrialba 17:447-449.

HAMADA, N. A. 2013. **Epidemiologia da mancha foliar de glomerella em macieira.** Tese (doutorado). Universidade Federal de Paraná, Curitiba-PR, p 117

HUERTA-PALACIOS, G.; HOLGUÍN-MELÉNDEZ, F.; BENÍTEZ-CAMILO, F.A.; TOLEDO-SRREOLA, J. 2009. **Anthracnose epidemiology [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) 94 Penz. And Sacc.] on mango cv. Ataulfo (*Mangifera indica* L.) in the Soconusco, Chiapas, Mexico.** Revista Mexicana de Fitopatologia, v. 27, n. 2, p. 93-105,

JIANG J., ZHAI H., LI H., WANG Z., CHEN Y., HONG N., WANG G., CHOGONG G., XU W. 2014. **Identification and characterization of *Colletotrichum fructicola* causing black spot on young fruit related to bitter rot of pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) in China.** Crop Protection, v. 58, p. 41-48.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I.S.; BECKER, W.F. 2000. **Mancha foliar da gala: principal doença de verão da cultura da macieira.** Agropecuária catarinense, v. 13, p. 14-20.

KATSURAYAMA, Y & BONETI, J.I.S. 2009. **Manejo das doenças de verão da macieira no sul do Brasil** In: STADNIK MJ (Ed.) **Manejo Integrado de Doenças da Macieira**. Florianópolis, CCA-UFSC, p. 45-64.

LUDWIG, N., LÖHRER, M., HEMPEL, M., MATHEA, S., SCHLIEBNER, I., MENEZEL, M., KIESOW, A., SCHAFFRATH, U., DEISING, H. B., & HORBACH, F. 2014. **Melanin is not required for turgor generation but enhances cell-wall rigidity in appressoria of the corn pathogen *Colletotrichum graminicola***. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 27, n.4, p. 315–327.

MORAES, S. R. G., ESCANFERLA, M. E. AND MASSOLA, N. S. 2015. **Prepenetration and Penetration of *Colletotrichum gloeosporioides* into Guava Fruit (*Psidium guajava* L.): Effects of Temperature, Wetness Period and Fruit Age**. *Journal of Phytopathology*, 163: 149–159.

NOE, JAMES P., STARKEY, THOMAS E. 1982. **Relationship of apple fruit maturity and inoculum concentration to infection by *Glomerella cingulata***. *Plant Disease*, v. 663, p. 79-381

PRUSKY D., ALKAN N., MENGISTE T., FLUHR R.. 2013 **Quiet and necrotrophic option of post harvest life during the development of the disease**. *Review Annual Phytopathology*, 51,155-176.

SANTOS, H.G.; JACOMINE, P.K.T.; ANJOS, L.H.C.; OLIVEIRA, V.A.; LUMBRERAS, J.F.; COELHO, M.R.; ALMEIDA, J.A.; CUNHA, T.J.F.; OLIVEIRA, J.B. 2013. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3.ed. Brasília: Embrapa, p. 353.

SCHMIDT, E.C., SCARIOT, L.A., ROVER, T., BOUZON, Z.L. 2009. **Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure**. *Micron*, v 40, 860-869.

SELVARAJ Y, PAL DK, EDWARD RM, RAWAL RD. 1999. **Changes in chemical composition of guava fruits during growth and development**. *Indian J Hort* 56:10–18.

STATSOFT. 2007. **Statistica: sistema de software de análise de dados**, versão 8.0. Tulsa: Stat Soft Inc.

SUTTON, T. B., AND SHANE, W. W. 1983. **Epidemiology of the perfect stage of *Glomerella cingulata* on apples**. Phytopathology v. 73, p. 1179-1183.

SUTTON, B.C. 1992. **The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum***. In: ***Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*** In: Eds. Bailey JA, Jeger MJ, CABI, Wallingford, UK, p 1-26.

TAYLOR, J. 1971. **A necrotic leaf blotch and fruit rot of apple caused by strain of *Glomerella cingulata***. Phytopathology, v. 61, p. 221-224,

VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; BECKER, W.; BONETI, J. I. S.; KATSURAYAMA, Y.; CZERMAINSKI, A. B. C. **Manejo das doenças de verão na produção integrada de maçã**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho,. 12 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 36). 2002.

VELHO A.C., ALANIZ S., CASANOVA L., MONDINO P., STADNIK M. J., 2015. **New insights into the characterization of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay**. Fungal Biology, 119, 4, 229-244.

VELHO A.C., ROCKENBACH, M. F., MONDINO P., STADNIK M. J., 2016. **Modulation of oxidative responses by a virulent isolate of *Colletotrichum fructicola* in apple leaves**, Fungal Biology. Available online 9 July 2016.

5 CAPÍTULO 3 – MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ASSOCIADOS ÀS INTERAÇÕES DE ISOLADOS DE *Colletotrichum fructicola* COM FRUTOS DE MAÇÃ EM DIFERENTES ESTAGIOS DE DESENVOLVIMENTO

5.1 RESUMO

Colletotrichum fructicola ocasiona na cultura da maçã duas importantes doenças como a mancha foliar de Glomerella (MFG) nas folhas e frutos em campo e a podridão amarga (PA) nos frutos em pós-colheita as quais afetam os rendimentos de maçã no Brasil. Informações sobre o processo infeccioso de *C. fructicola* nos frutos de maçã em diferentes estágios de desenvolvimento do fruto é rara na literatura. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar como a infecção de isolados de *C. fructicola* provenientes de folhas com sintomas de MFG (MANE 57 e 147) ou de frutos com PA (MANE 34 e 41) pode ser afetada pelos mecanismos de resistência de cada estágio de desenvolvimento (fruto verde-J1, intermediário-J2 e maduro-L) nos frutos de maçã. Foram avaliadas a patogenicidade, respostas bioquímicas e histopatológicas à infecção de isolados de *C. fructicola* em frutos colhidos e levados a laboratório onde foram inoculados. O isolado MANE 57 foi o único a ocasionar PA nos três estágios de desenvolvimento em frutos com ou sem fermento. O isolado MANE 41 ocasionou PA em frutos com fermento nos estágios J2 e L. Os isolados MANE 34 e 147 causaram somente uma lesão restrita que não evoluiu para PA em frutos com fermento. A atividade de peroxidases, fenilalanina-amonialase e concentração de compostos fenólicos totais foi alterada às 24, 48 e 72 horas após inoculação (HAI) de isolados de *C. fructicola* em frutos dos três estágios de desenvolvimento. A nível microscópico, o isolado MANE 57 foi o único a invadir células da epiderme e do mesocarpo nos três estágios de desenvolvimento do fruto. Os isolados MANE 34, 41 e 147 colonizaram as células da epiderme e do mesocarpo em frutos intermediários e frutos maduros. Muitas células reagiram à infecção de *C. fructicola* pelo acúmulo de compostos fenólicos. Os resultados sugerem que isolados de *C. fructicola* provenientes de folhas ou frutos causam PA em frutos de maçã em diferentes estágios de desenvolvimento independente das respostas de defesa envolvidas nas interações.

5.2 INTRODUÇÃO

A cultura da maçã no sul do Brasil é considerada uma das mais importantes. A suscetibilidade às doenças tem sido um fator importante que diminui significativamente a qualidade das maçãs e rendimento da produção. Dentre as principais doenças da macieira destacam-se a mancha foliar de *Glomerella* (MFG) e podridão amarga (PA) ambas ocasionadas por espécies de *Colletotrichum* afetando principalmente a cultivar Gala e seus clones os quais representam mais de 60% da área plantada (BONETI et al., 2002; KATSURAYAMA & BONETI 2009).

Em folhas, espécies de *Colletotrichum* ocasionam lesões necróticas, que em condições favoráveis podem causar a queda prematura e desfolha nas plantas infectadas, caracterizando a MFG. Nos frutos, surgem pequenas lesões marrons, deprimidas com 1 a 2 mm de diâmetro, e que normalmente não evoluem para PA. Outra doença causada por *Colletotrichum* na macieira é a PA, onde os sintomas ocorrem nos frutos em pré e pós-colheita e se apresentam como lesões circulares, deprimidas e no centro da podridão observa-se uma coloração clara ou escura que corresponde aos acérvulos com alta produção de conídios (KATSURAYAMA et al., 2000; VALDENITO SAHUENZA et al., 2002; HAMADA, 2013).

O uso de fungicidas tem sido a única solução para a prevenção dessas doenças em plantas de maçã da cultivar Gala. Mas quando o fruto está chegando perto da colheita não é permitido o uso de fungicidas pelo período de carência dos produtos, mas é justamente nesse intervalo de tempo que ocorrem as condições favoráveis para o desenvolvimento dessas duas doenças (KATSURAYAMA & BONETI 2009; HAMADA 2013). O uso de fungicidas tem se tornado uma problemática pelo impacto negativo no ambiente e na saúde humana e animal. A melhor compreensão da interação patógeno-hospedeiro, assim como respostas de defesa do hospedeiro poderiam ajudar a estruturar novas e mais seguras estratégias de controle (STADNIK et al., 2009).

Uma das características de espécies de *Colletotrichum* é a capacidade de desenvolver infecções quiescentes em frutos imaturos, tornando-se inativo até o amadurecimento do fruto (BAILEY et al., 1992). O processo infeccioso de espécies de *Colletotrichum* geralmente começa pela deposição do conídio na superfície do fruto, germinação

pela formação do tubo germinativo dando origem ao apressório e penetração. Nesse momento é que se diferenciam as espécies de *Colletotrichum* com duas formas de penetração e colonização dos tecidos. Uma chamada hemibiotrófica intracelular, que apresenta penetração direta no hospedeiro pela formação de uma vesícula primária seguida pela produção de hifas secundárias e, em fases posteriores do processo infeccioso, o fungo torna-se necrotrófico. A outra forma de penetração e colonização dos tecidos é a necrotrófica intramural subcuticular, onde o fungo cresce superficialmente na cutícula produzindo hifas finas necrotróficas que invadem o tecido hospedeiro intracelularmente (PERES et al., 2005).

As respostas de defesa para isolados de *C. fructicola* em frutos de diferentes estágios de desenvolvimento de maçã, assim como a compreensão dos processos infecciosos que eles realizam, são desconhecidos. Estratégias de defesa contra a invasão do patógeno podem ser moduladas pela maturação dos frutos (SU et al., 2011). A idade dos frutos pode influenciar nos processos de pré-infecção e infecção de diversos fungos fitopatogênicos. Infecções geralmente tornam-se ativas quando o fruto encontra-se maduro, estas infecções podem ocorrer semanas ou meses antes dos sintomas aparecerem (JARVIS, 1994). Resistência de frutos verdes ao ataque patogênico pode ser explicada pela anatomia do fruto, disponibilidade de nutrientes para o patógeno, espessura da cutícula, presença de compostos antifúngicos que diferem em composição de acordo com estágio de maturação do fruto, alteração de pH e produção de espécies reativas de oxigênio (PRUSKY e LICHTER 2008).

Uma das reações mais rápida de defesa em frutos é a explosão oxidativa caracterizada pelo acúmulo rápido de espécies reativas de oxigênio (ERO) compostas principalmente do ânion de superóxido e de peróxido de hidrogênio no local da infecção (TORRES et al., 2006). Respostas pela produção de ERO em frutos podem induzir os patógenos a entrar em estado de quiescência conforme o trabalho de Prusky et al., (1988) onde ERO foram localizadas em frutos verdes resistentes de abacate após a tentativa de penetração de *Colletotrichum gloeosporioides* (PRUSKY et al., 1988). As peroxidases (POX) têm sido associadas a vários mecanismos de defesa tais como respostas de hipersensibilidade aos ataques de patógenos em frutos, ao processo da polimerização e síntese de lignina (VAN LOON et al., 2006; O'BRIEN et al., 2012).

Aumento na atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) e acúmulo dos compostos fenólicos também têm sido descritos por estarem diretamente envolvidos na síntese de fenóis e lignina, principais formadores de barreiras físicas em frutos contra a infecção de patógenos. Estes compostos também atuam como agentes antimicrobianos, inibindo a penetração dos fungos ou a absorção de nutrientes pelo fungo invasor (PRUSKY et al., 1996).

Desta forma, o objetivo desse trabalho foi determinar a patogenicidade de isolados de *C. fructicola* provenientes de MFG e PA em frutos de maçã de diferentes estágios de desenvolvimento e avançar no entendimento dos mecanismos de defesa envolvidos na interação patógeno-hospedeiro.

5.3 METODOLOGIA

5.3.1 Obtenção dos frutos

Frutos de maçã da cultivar Gala foram coletados a campo na estação experimental da Epagri no município de São Joaquim-SC, nas safras 2013/2014, 2014/2015 e 2015/2016 e transportados imediatamente em caixas de acondicionamento ao Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina – CCA/UFSC. Todos os frutos foram desinfestados superficialmente, submergindo-os durante 30 segundos em uma solução de hipoclorito de sódio a 1% enxaguados com água corrente e colocados sobre uma mesa para secar a temperatura ambiente. Posteriormente os frutos foram armazenados até o desenvolvimento dos experimentos (± 7 dias) em câmara refrigerada a 4°C, localizada no Laboratório de Tecnologia de Leite e Derivados do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da mesma Universidade, até a realização dos experimentos.

Os frutos coletados foram classificados em três estágios de maturação (J1, J2 e L) segundo a metodologia adotada por Gautier (1988) onde J corresponde a frutos imaturos (tabela 3.1) e L a frutos maduros.

Tabela 3.1. Características e estágios de desenvolvimento de frutos de maçã da cultivar Gala coletados na Estação Experimental da EPAGRI localizada no município de São Joaquim- SC.

Características	Estágio J1 (fruto verde)	Estágio J2 (fruto intermediário)	Estágio L (fruto maduro)
Dias após queda das pétalas	30±7	55±5	131±7
Diâmetro (mm)	28±4	44±5	64±6
Peso (g)	25±6	54±8	150±8

5.3.2 Isolados utilizados

Os isolados utilizados foram previamente identificados por Velho et al., (2015) como *C. fruticola*. Nos experimentos foram utilizados os isolados MANE 34, 41, 57 e 147 (Tabela 3.2) os quais estão depositados na coleção do laboratório de fitopatologia da UFSC.

Tabela 3.2. Características dos isolados de *Colletotrichum fruticola* utilizados nas inoculações de frutos maçã da cultivar Gala em ensaios realizados em condições controladas

ISOLADO	SINTOMA	TECIDO DE ORIGEM	PROCEDÊNCIA
MANE 34	Podridão amarga (PA)	Fruto	Vacaria - RS
MANE 41	PA	Fruto	Fraiburgo - SC
MANE 57	Mancha foliar de Glomerella (MFG)	Folha	Vacaria - RS
MANE 147	MFG	Folha	Urubici - SC

Adaptado de Velho et al., 2015¹

Para a obtenção de inóculo, foram usadas culturas desenvolvidas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro com meio de batata dextrose Agar (BDA) por 10 dias a 25 °C e 12 h de fotoperíodo. As colônias formadas foram raspadas superficialmente com espátula de Drigalsky e a concentração da suspensão de conídios foi ajustada para 1×10^6 conídios.mL⁻¹, com o auxílio de uma câmara de Neubauer (ARAUJO et al., 2008).

5.3.3 Teste de patogenicidade

Dois métodos de inoculação com *C. fructicola* foram avaliados em frutos em três estágios de desenvolvimento, com ferimento e sem ferimento. No primeiro caso, foram realizados dois orifícios opostos na região equatorial do fruto com auxílio de uma agulha (1 mm de diâmetro x 5 mm de profundidade) e em seguida estes ferimentos receberam 10 µL de suspensão de conídios de *C. fructicola*. Frutos sem ferimento foram pulverizados com uma suspensão de conídios ($1 \pm 0,5$ mL) com auxílio de pistola (LPHV, pressão máxima 58psi, bico 0,7mm de diâmetro, marca Grifo, Itália) acoplada a um motocompressor de ar (marca Schulz, Brasil; pressão de 25lbf/pol2; potência de 180W; vazão 105mL/min).

Os frutos inoculados foram mantidos em caixas fechadas (40x27x13 cm), no escuro em câmara úmida, a temperatura ambiente (25°C) e foram avaliados diariamente até o aparecimento dos primeiros sintomas para registrar o período de incubação.

Para os frutos com ferimento, registrou-se o diâmetro médio das lesões. Na avaliação do progresso da lesão em frutos inoculados com ferimento foi considerada a média de duas lesões no sentido vertical e horizontal. Para os frutos sem ferimento, foram contadas e mensuradas as lesões aos 14 dias após a inoculação (DAI).

5.3.4 Determinação de atividade de peroxidases, compostos fenólicos e fenilalanina amônia-liase

Frutos de maçã nos três estágios (J1, J2 e L) foram inoculados por pulverização (sem ferimento) e mantidos em bandejas plásticas com 100% de umidade a 25°C. Quatro discos de frutos (8 mm diâmetro x 5 mm de profundidade) foram coletados com auxílio de furador metálico para determinação enzimática às 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI). Os discos foram congelados por imersão em nitrogênio líquido e então, armazenados a -80°C até o momento da análise. Para todas as análises, os discos foram macerados usando-se cadinho e pistilo de porcelana na presença de nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó e seguidamente adicionado o tampão na proporção 1:3 (p/v) correspondente para cada análise.

Para a determinação das peroxidases (POX), ao pó obtido foi adicionado tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0) contendo ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA) 0,1 mM, polivinilpirrolidona (PVP) 1 %. A suspensão foi transferida para microtubos de 2 mL (Axygen, EUA) e centrifugada (modelo 5804R, Eppendorf, Alemanha) a $20.000 \times g$ 30 min⁻¹, a 4° C. O sobrenadante foi então coletado e armazenado em gelo até o momento da determinação da atividade da enzima. A atividade de POX foi medida espectrofotometricamente conforme Stadnik & Buchenauer (2000). Para tal, 20 µL do extrato proteico foram adicionados em 280 µL de tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 6,0), contendo 0,25% de guaiacol (v/v) (Sigma, EUA) e 0,125% peróxido de hidrogênio (v/v) (Merck, Alemanha). Os valores de absorbância da reação foram registrados a cada 30 segundos durante 3 minutos a 30°C por meio de um multileitor de microplacas (Spectramax Paradigm Molecular Devices, EUA). As atividades de POX foram expressas em unidades de densidade óptica a 470 nm/proteína/min.

Na quantificação de compostos fenólicos totais (CFT), adicionaram-se 1,5 mL de metanol 80 % acidificado (metanol: HCl = 80:1, v/v) às amostras e macerou-se por 30 segundos. Em seguida a solução foi centrifugada a $3.500 \times g$ por 10 minutos e recolhido o sobrenadante. Na quantificação de CFT, em 0,5 mL do sobrenadante misturou-se 0,5 mL de metanol 95 % (v/v). A essa mistura foram adicionados 1 mL de etanol 95 %, 1 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma, EUA). Após 5 min, acrescentou-se 1 mL de Na₂CO₃ 5 % (m/v), e incubaram-se as amostras no escuro por 1 h à temperatura ambiente. A absorbância da solução final foi mensurada em espectrofotômetro (DO 725 nm) e a quantificação de CFT foi baseada em uma curva padrão (0,0 - 100 µg) de ácido gálico. Os resultados foram expressos em µg de equivalentes de ácido gálico por grama de massa fresca (µg EAG g⁻¹ MF) (MCCUE et al., 2000).

Para a determinação da atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL), foi adicionado à amostra tampão borato de sódio 25 mM (pH 8,8) contendo EDTA 0,1 mM e PVP (0,5 %). A solução obtida foi centrifugada a $20.000 \times g$ 30 min⁻¹ a 4 °C e o sobrenadante (extrato proteico) recuperado. A atividade enzimática foi determinada segundo Falcón et al. (2008), com adaptações. Como substrato, foi utilizada fenilalanina 50 mM em tampão borato de sódio 100 mM (pH 8,8). Em 450 µL do substrato, foram adicionados 50 µL do extrato proteico e a mistura incubada a 40 °C por 1h. A reação foi interrompida pela adição

de 200 μL de HCl 5 N e banho de gelo por 5 min. Posteriormente, 300 μL de água destilada foram adicionados e a absorbância da solução final mensurada a 290 nm. Os resultados foram expressos como nmol de ácido trans-cinâmico formado por mg de proteína por minuto de reação (nmol ácido trans-cinâmico.mg proteína⁻¹.min⁻¹).

Para a quantificação do conteúdo total de proteínas nas amostras coletadas foi empregado o método de Bradford (1976), utilizando o reagente “coomassie brilliant blue” (CBB- Sigma, EUA). As leituras de absorbância das soluções foram mensuradas a 595 nm. Posteriormente, foi realizada a conversão dos valores de absorbância em concentração de proteína solúvel. Esta conversão foi feita por comparação com as leituras de soluções padrões de albumina de soro bovino (BSA).

5.3.5 Processamento de tecidos de frutos infectados para microscopia de luz

Para a avaliação do processo infeccioso de *C. fruticola*, discos contendo epicarpo de frutos foram coletados com auxílio de furador metálico (8mm de diâmetro e 5 mm de profundidade) nos tempos 24 HAI, 72 HAI e 14 DAI. Discos coletados a partir de frutos não inoculados serviram como controle. Para tal, foi coletado um disco de cada fruto de cada tratamento e constituído um pool de 16 discos como uma única amostra para cada tratamento. Desses 16 discos, foram escolhidos aleatoriamente 3 discos para o processamento da amostra. Os discos foram fixados em solução Karnovsky modificada contendo paraformaldeído 4% e tampão fosfato 0,2 M (v/v) e submetidos a uma bomba de vácuo para remoção do ar dos tecidos durante 24 horas a 4°C. As amostras foram lavadas duas vezes em tampão fosfato 0,1 M. Em seguida, passaram por desidratação em serie etílica (30, 50, 70, 90 e 100 %) permanecendo durante 30 minutos em cada etapa. Após a desidratação, os tecidos foram infiltrados com resina metacrilato (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha). Os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo Leica RM 2135. Secções seriadas transversais (5 μ de espessura) foram coradas com azul de toluidina (ATO) a 0,5% (Merck Darmstadt, Alemanha) para verificar a presença de polissacarídeos de ácido por meio de reação metacromática e ácido periódico de Schiff (PAS) utilizada para identificar polissacarídeos neutro. Cada lâmina avaliada apresentava 36 fragmentos de tecido de

frutos de maçã. Cada secção foi observada em microscópio Olympus BX 41 equipado com captura de imagem Q Pro 5.1 software (Qimaing Corporation, Austin, TX, USA) (GAHAN, 1984; SCHMIDT et al., 2009). Para a avaliação da germinação e formação de apressórios às 24 HAI, discos de frutos foram coletados como anteriormente descritos e clareados (etanol: ácido acético, 3:1, v/v) por 48 horas. Ao final deste período, a solução de clareamento foi substituída por uma solução de conservação (ácido láctico, glicerol e água, 1:1:1, v/v/v) e avaliada em microscópio como descrito anteriormente.

5.3.6 Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Para avaliação da doença e das análises bioquímicas, o delineamento utilizado foi completamente casualizado com quatro repetições. Na avaliação da doença cada unidade experimental foi constituída por quatro frutos, enquanto que nas avaliações bioquímicas, de cada fruto foi retirado um disco e a parcela experimental foi composta por quatro discos para cada enzima em cada tempo de amostragem. Os experimentos foram repetidos três vezes durante as safras de 2013/2014, 2014/2015 e 2015/2016 com resultados semelhantes e um deles foi selecionado para representar os resultados.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para determinar se existiam diferenças significativas entre os tratamentos. Para a separação de médias, foi usado o teste Tukey ($p \leq 0,05$). A análise estatística foi realizada utilizando o software Statistica 8.0 (STATSOFT, 2007).

5.4 RESULTADOS

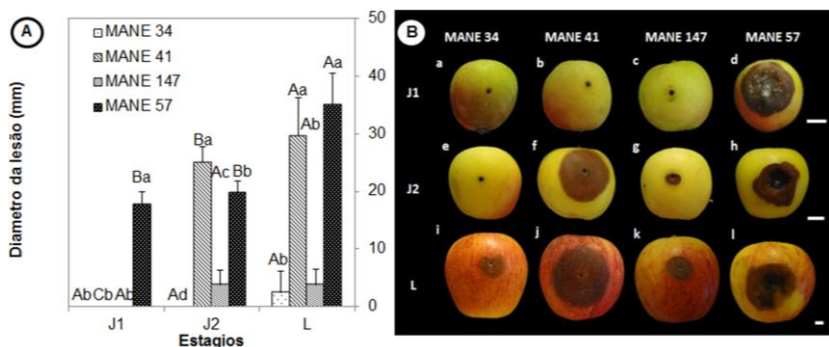
5.4.1 Patogenicidade dos frutos em laboratório

Inoculação de *Colletotrichum fructicola* em frutos com ferimento

Os isolados MANE 34, 41 e 147 não provocaram sintomas de PA nos frutos que foram inoculados no estágio J1 sob condições controladas (Figura 3.1). Neste mesmo estágio, frutos inoculados pelos isolados MANE 57 e 147 exibiram um halo clorótico ao redor da lesão aos quatro e sete DAI com *C. fructicola* (Figura 3.2). Frutos do estágio

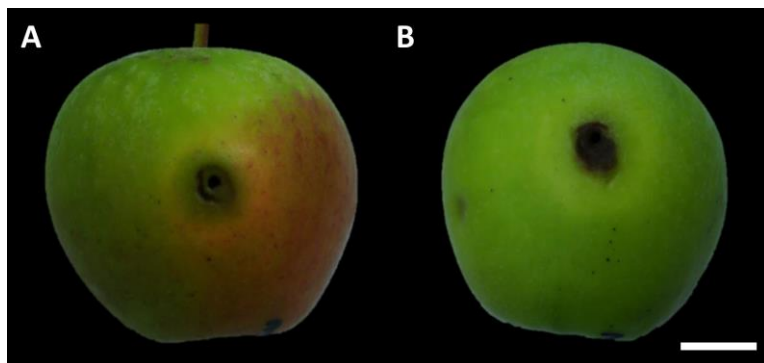
J1 inoculados com o isolado MANE 57 apresentavam lesões de coloração marrom, aprofundada e com aproximadamente 6 mm de diâmetro aos quatro DAI (Figura 3.2) e aos 14 DAI, foi possível observar lesões peculiares de PA com aspecto deprimido e abundante esporulação no centro da podridão (Figura 3.1B). As lesões de frutos inoculados com o isolado MANE 57 mediam em torno de 16 a 20 mm (Figura 3.1A). Somente o isolado MANE 57 foi capaz de causar PA em frutos de todos os estágios de desenvolvimento (Figura 3.1). Independente do isolado inoculado, no estágio L foram observadas as lesões com o maior diâmetro (Figura 3.1). Os isolados MANE 41 e 57 foram os mais agressivos apresentando o maior diâmetro de lesões nos estágios J2 e J3 respectivamente (Figura 3.1).

Figura 3.1. Diâmetro médio das lesões aos 14 dias após a inoculação com os isolados MANE 34 (a, e, i), 41 (b, f, j), 147 (c, g, k) e 57 (d, h, l) de *Colletotrichum fruticola* em frutos de maçã da cultivar Gala nos estágios J1 (fruto verde - a, b, c, d), J2 (fruto intermediário - e, f, g, h) e L (fruto maduro - i, j, k, l). Nas letras d, f, h, j, l frutos possuem sintomas típicos de podridão amarga, enquanto que nas letras g, i, k as lesões são pequenas e restritas. Frutos sem lesão em a, b, c, e. Letras maiúsculas iguais nos estágios fenológicos para um mesmo isolado e minúsculas iguais para isolados dentro de um mesmo estágio não apresentam diferença significativa ($p \leq 0,05$) conforme determinado pelo teste de Tukey. Barra representa 1 cm. Dados transformados para $\sqrt{x+1}$



Fonte: Autor

Figura 3.2. Frutos no estágio J1 de maçã da cultivar Gala, quatro dias após inoculação de isolados (A) MANE 147 e (B) 57 de *Colletotrichum fructicola* apresentando halo clorótico ao redor do local da inoculação. Barra representa 1cm.



Fonte: Autor

Lesões provocadas pelo isolado MANE 41 evoluíam para PA quando os frutos foram inoculados no estágio J2 e L (Figura 3.1B). Os sintomas de PA foram visíveis aos quatro e sete DAI com o isolado MANE 41 e apresentavam em média 12 mm de diâmetro (dados não mostrados). Aos 14 DAI com o isolado MANE 41, lesões de PA mediam 27 mm de diâmetro e possuíam alta esporulação no centro da podridão (Figura 3.1).

Em contraste aos isolados MANE 41 e 57, os isolados MANE 34 e 147 causaram somente lesões pequenas e restritas em frutos quando inoculados nos estágios J2 e L (Figura 3.1B). Estas lesões apresentavam em média 6 mm de diâmetro aos 14 DAI (Figura 3.1A) e não evoluíam para PA (Figura 3.1B).

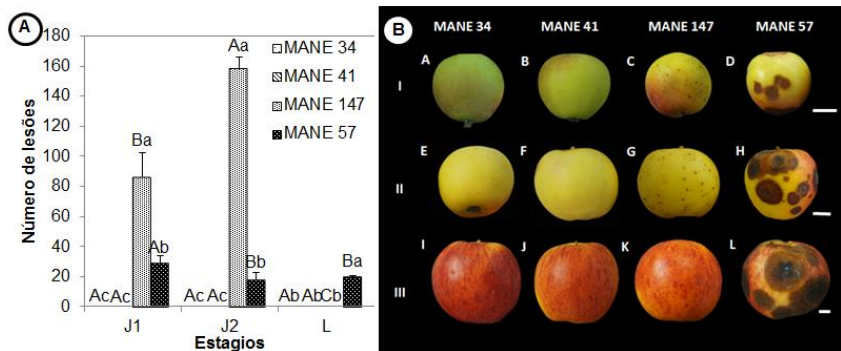
Inoculação de *C. fructicola* em frutos sem fermentos

Os isolados MANE 34 e 41 não causaram lesões típicas da MFG e PA na superfície de frutos inoculados sem fermento nos três estágios fenológicos estudados (Figura 3.3). Frutos de maçã inoculados com o isolado MANE 147 nos estágios J1 e J2 apresentaram inicialmente lesões marrons, pequenas e aprofundadas aos seis DAI (dados não mostrados). Estas lesões foram semelhantes aos típicos sintomas da MFG em frutos e não evoluíam para PA (Figura 3.3B).

Frutos inoculados com o isolado MANE 57 inicialmente apresentavam lesões típicas da MFG, embora, algumas dessas evoluíram para PA aos 14 DAI (Figura 3.3B). Aproximadamente 25% dos frutos inoculados com o isolado MANE 57 no estágio J1 apresentavam lesões de MFG que evoluíram para PA (Figura 3.3A). Todos os frutos inoculados com o isolado MANE 57 nos estágios J2 e L mostravam lesões típicas de PA (Figura 3.3A).

Aos 14 DAI foi observada diferença significativa para número de lesões entre os isolados MANE 147 e 57, o isolado MANE 147 provocou aumento de 66 e 90% no número de lesões quando frutos foram inoculados nos estágios J1 e J2 respectivamente, quando comparado ao isolado MANE 57 (Figura 3.3A). Frutos infectados no estágio J2 com o isolado MANE 147 apresentaram 65% mais lesões quando comparado ao estágio J1, enquanto que no estágio L não ocorreu manifestação de sintoma (Figura 3.3A). Frutos inoculados com o isolado MANE 57, apresentaram mais lesões quando infectados no estágio J1 em comparação ao J2 e L (Figura 3.3A).

Figura 3.3. Número de lesões aos 14 dias após a inoculação com isolados MANE 34 (a, e, i), MANE 41 (b, f, j), MANE 147 (c, g, k) e MANE 57 (d, h, l) de *Colletotrichum fructicola* em frutos de maçã da cultivar Gala dos estágios J1 (a, b, c, d), J2 (e, f, g, h) e L (i, j, k, l). Frutos com sintomas de podridão amarga (d, h, l), pequenas lesões (c, g) ou ausência de sintomas (a, b, e, f, i, j, k). Letras maiúsculas iguais nos estágios fenológicos para um mesmo isolado e minúsculas iguais para isolados dentro de um mesmo estágio não apresentam diferença significativa ($p \leq 0,05$) conforme determinado pelo teste de Tukey. Barra representa 1 cm.



5.4.2 Atividade de peroxidases, fenilalanina amoniliase e compostos fenólicos.

Os fatores estágios de desenvolvimento dos frutos e inoculação com diferentes isolados de *C. fructicola* afetaram a atividade de POX em frutos de maçã às 24, 48 e 72 HAI (Figura 3.4A, B e C). Frutos do estágio J1 às 24 HAI com o isolado MANE 34 apresentaram a maior atividade, e com o isolado MANE 57, a menor atividade quando comparados entre isolados (Figura 3.4A). Nos frutos no estágio J2 não houve diferença entre os isolados inoculados (Figura 3.4A). Durante o estágio L, os frutos inoculados com o isolado MANE 147 apresentaram a maior atividade quando comparados aos demais isolados (Figura 3.4A). Só frutos no estágio L inoculados com o isolado MANE 147 apresentaram maior atividade quando comparados com frutos não inoculados (Figura 3.4A). A atividade de POX foi significativamente maior em frutos infectados nos estágios J1 e J2 às 48 HAI com o isolado MANE 57, quando comparado aos demais isolados (Figura 3.4B). Em frutos no estágio L, não houve diferença entre os isolados inoculados (Figura 3.4B). Frutos inoculados com o isolado MANE 147 apresentaram a maior atividade da POX em frutos no estágio J1 quando comparado aos estágios J2 e L (Figura 3.4B). Frutos inoculados com o isolado MANE 57 apresentaram maior atividade da POX nos estágios J1 e J2 quando comparado a frutos não inoculados (Figura 3.4B). Às 72 HAI, em frutos dos estágios J1 e L não houve diferença entre os isolados (Figura 3.4C). Só o isolado MANE 57 apresentou maior atividade da POX em frutos inoculados no estágio J2 quando comparados aos demais isolados e estágios J1 e L (Figura 3.4C). Independente do isolado de *C. fructicola* utilizado para inoculação, frutos infectados nos estágios J1 e L apresentaram menor atividade da POX quando comparados a frutos não inoculados (Figura 3.4C).

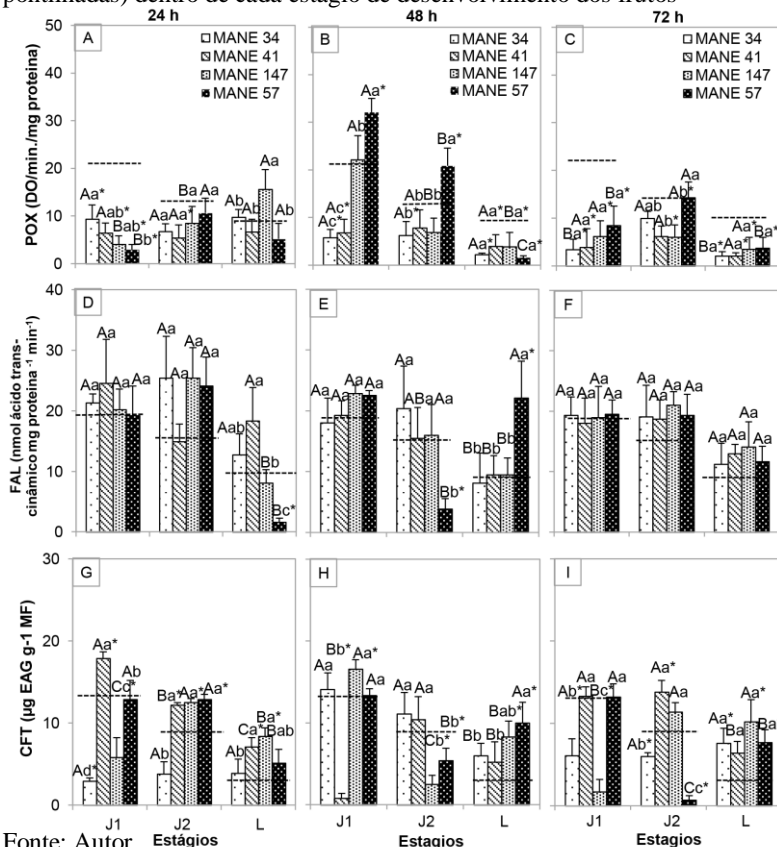
Os fatores estágios de desenvolvimento dos frutos e inoculação com diferentes isolados de *C. fructicola* afetaram a atividade de FAL em frutos de maçã às 24, e 48 HAI (Figura 3.4D, E). A atividade da FAL em frutos no estágio J1 e J2 não foi alterada às 24 HAI com qualquer dos isolados de *C. fructicola* (Figura 3.4D). Frutos no estágio L inoculados com o isolado MANE 41 apresentaram maior atividade de FAL quando comparado com frutos inoculados com outros isolados (Figura 3.4D). Frutos no estágio L inoculados com o isolado MANE 57 apresentaram a menor atividade da FAL às 24 HAI quando comparado

com frutos inoculados com outros isolados e frutos não inoculados (Figura 3.4D). A atividade da FAL em frutos no estágio J1 não foi alterada às 48 HAI com qualquer dos isolados de *C. fructicola* (Figura 3.4E). Frutos inoculados com o isolado MANE 57 apresentaram menor atividade da FAL no estágio J2 quando comparados com frutos inoculados com outros isolados e quando comparado com frutos não inoculados às 48 HAI (Figura 3.4E). Frutos no estágio L, inoculados com o isolado MANE 57 apresentaram maior atividade quando comparado aos outros isolados (Figura 3.4E). Frutos inoculados no estágio L com os isolados MANE 34, 41 e 147 apresentaram menor atividade da FAL quando comparado com frutos inoculados nos estágios J1 e J2 (Figura 3.4E). Às 72 HAI não houve diferença significativa na atividade de FAL em frutos inoculados com diferentes isolados de *C. fructicola* e estágios de desenvolvimento (Figura 3.4F).

Os fatores estágios de desenvolvimento dos frutos e inoculação com diferentes isolados de *C. fructicola* alteraram a concentração de CFT nos frutos de maçã às 24, 48 e 72 HAI (Figura 3.4G, H, I). Frutos no estágio J1 inoculados com o isolado MANE 41 apresentaram a maior concentração e com o isolado MANE 34 a menor concentração de CFT quando comparados com outros isolados às 24 HAI (Figura 3.4G). Frutos inoculados com o isolado MANE 147 apresentaram a maior concentração de CFT no estágio J1 às 48 HAI (Figura 3.4H). Frutos inoculados com o isolado MANE 57 no estágio L apresentaram a menor concentração de CFT às 24 HAI quando comparado aos estágios J1 e J2 (Figura 3.4G). Frutos no estágio L inoculados com o isolado MANE 147 apresentaram a maior concentração e com o isolado MANE 34 a menor concentração quando comparados aos outros isolados (Figura 3.4G). Frutos do estágio J1 inoculados com o isolado MANE 41 apresentaram a menor concentração de CFT quando comparado a frutos inoculados com outros isolados (Figura 3.4H). Frutos do estágio J2 inoculados com os isolados MANE 34 e 41 apresentaram a maior concentração de CFT quando comparado aos outros isolados (Figura 3.4H). Frutos do estágio L inoculados com o isolado MANE 57 apresentaram a maior concentração de CFT às 48 HAI quando comparado aos frutos inoculados com outros isolados (Figura 3.4H). Frutos inoculados com os isolados MANE 147 e 57 apresentaram maior concentração de CFT no estágio J1 quando comparado aos estágios J2 e L às 48 HAI (Figura 3.4H). Em frutos no estágio J1 às 72 HAI do isolado MANE 147 apresentou a menor concentração de CFT quando comparado aos demais isolados (Figura 3.4I). Frutos no estágio J2 inoculados com o

isolado MANE 57 apresentaram a menor concentração de CFT quando comparados aos outros isolados (Figura 3.4I). Independente dos isolados inoculados não houve diferença na concentração de CFT às 72 HAI em frutos do estágio L (Figura 3.4I).

Figura 3.4. Atividade de peroxidases (POX: A, B, C.), fenilalanina amônia-liases (FAL: D, E, F) e acumulação de compostos fenólicos totais (CFT: G, H, I), em frutos de maçã de diferentes estágios de desenvolvimento da cultivar Gala às 24, 48 e 72 horas após a inoculação com diferentes isolados de *Colletotrichum fructicola* (MANE 34, 41, 147, 57). Letras maiúsculas iguais nos estágios fenológicos para um mesmo isolado e minúsculas iguais para isolados dentro de um mesmo estágio não apresentam diferença significativa ($p \leq 0,05$) conforme determinado pelo teste de Tukey. Asteriscos representa diferença significativa quando comparado a frutos não inoculados (linhas pontilhadas) dentro de cada estágio de desenvolvimento dos frutos



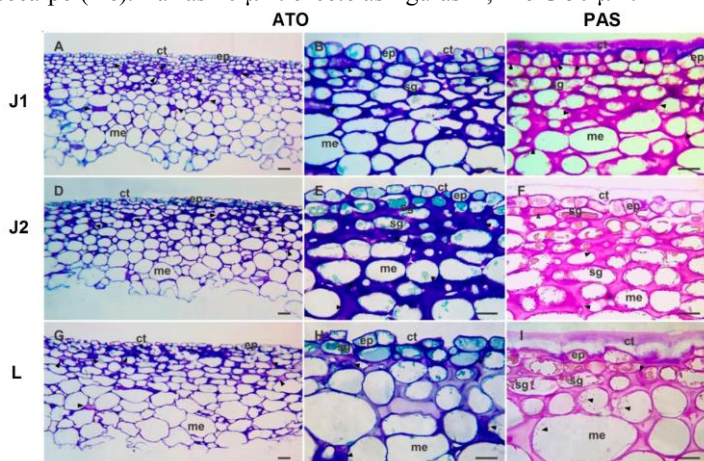
Fonte: Autor

5.4.3 Processo infeccioso de isolados de *Colletotrichum fruticola* em frutos de maçã com diferentes estágios de desenvolvimento

Frutos sadios

Os tecidos dos frutos de maçã apresentam uma cutícula e abaixo da cutícula podem ser observadas as células epidérmicas que no estágio J1, apresentam-se pequenas, juntas e com grande acúmulo de compostos fenólicos e grãos de amido (Figura 3.5A, B e C). As células do mesocarpo aumentam de tamanho conforme o estágio de desenvolvimento do fruto (Figura 3.5). Tecidos de frutos do estágio L aparentemente apresentam escassa acumulação de compostos fenólicos (Figura 3.5G, H, I)

Figura 3.5. Micrografias de luz de seções transversais de epicarpo de frutos de maçã de diferentes estágios de desenvolvimento J1 (fruto verde; A, B, C), J2 (fruto intermediário; D, E, F) e L (fruto maduro; G, H, I). Nos fragmentos de frutos de distintos estágios foi observado a cutícula, seguida de pequenas células epidérmicas, com grande acúmulo de compostos fenólicos (cabeça de seta) e grãos de amido. Secções coradas com azul de toluidina (ATO) (A, B, D, E, G, H) mostram reação metacromática de parede celular das células e polissacarídeos ácidos. Secções coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) (C, F, I) apresentam reação positiva para amido e parede celular. Células do mesocarpo de maior tamanho foram associadas com estágios de desenvolvimento mais avançados e apresentavam escassa acumulação de compostos fenólicos. Células epidérmicas (ep), cutícula (ct), grão de amido (sg), mesocarpo (me). Barras 20 μm . exceto as figuras A, D e G 50 μm .



Fonte: Autor

Estágio J1 (Fruto verde)

Conídios dos isolados MANE 34, 41 e 147 de *C. fruticola* germinaram e formaram apressório na cutícula de frutos do estágio J1. No entanto, não foram observadas hifas fúngicas nas células epidérmicas e do mesocarpo às 24 e 72 HAI (Figura 3.6A, 3.6C, 3.6D, 3.6E, 3.6F, 3.7A, 3.7B, 3.7C, 3.7D, 3.7E e 3.7F). Conídios do isolado MANE 57 germinaram, formaram apressório e colonizaram massivamente células epidérmicas e do mesocarpo às 24 e 72 HAI (Figura 3.6G, 3.6H, 3.7G e 3.7H). Algumas células epidérmicas e do mesocarpo reagiram à infecção fúngica pelo acúmulo de compostos fenólicos (Figura 3.6G, 3.6H, 3.7G e 3.7H). Às 72 HAI com o isolado MANE 57 algumas células epidérmicas e do mesocarpo, apresentavam descolamento da membrana indicando uma possível morte celular (Figura 3.7H). Aos 15 DAI foi observado acérvulos do fungo com grande produção de conídios (Figura 3.8A e 3.8B).

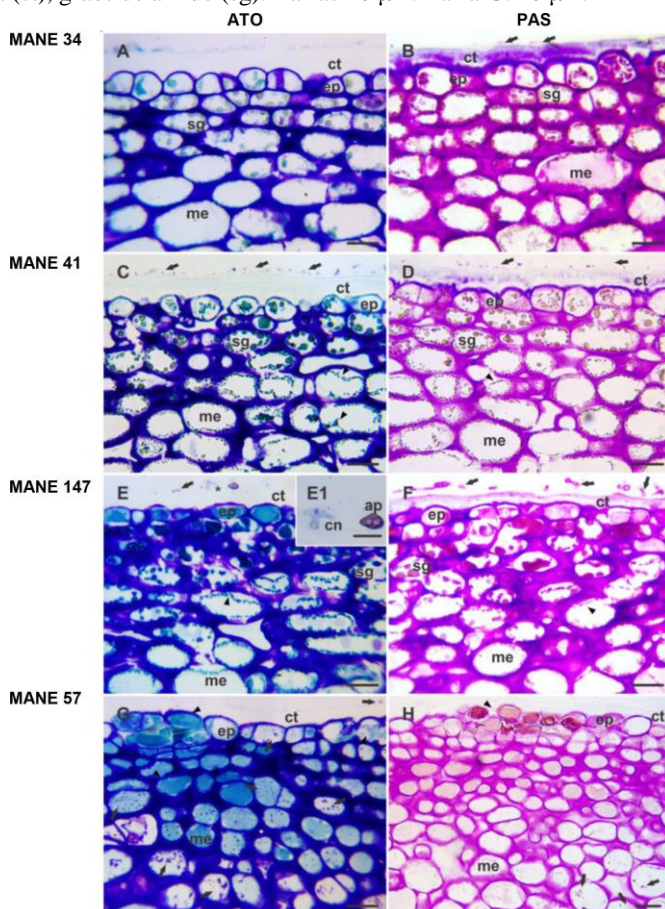
Estágio J2 (Fruto intermediário)

Conídios dos isolados MANE 34 e 147 germinaram e formaram apressórios na cutícula de frutos infectados no estágio II, embora não foram detectadas hifas do fungo nas células epidérmicas e do mesocarpo às 24 HAI (figura 3.9A, B, E e F). Em contraste, às 72 HAI foi possível observar hifas dos isolados MANE 34 e 147 de *C. fruticola* colonizando células do mesocarpo com rara acumulação de composto fenólicos nas células infectadas (Figura 3.10A, B, E, F). Às 24 e 72 HAI foi observado abundante colonização das hifas dos isolados MANE 41 e 57 nas células epidérmicas e do mesocarpo (Figura 3.9C, 3.9D, 3.9G, 3.9H, 3.9C, 3.10D, 3.10G e 3.10H). Muitas células reagiram a infecção de *C. fruticola* pela acumulação de compostos fenólicos, principalmente para o isolado MANE 57 às 72 HAI (Figura 3.9C, 3.9D, 3.9G, 3.9H, 3.10C, 3.10D, 3.10G e 3.10H).

Estágio L (Fruto maduro)

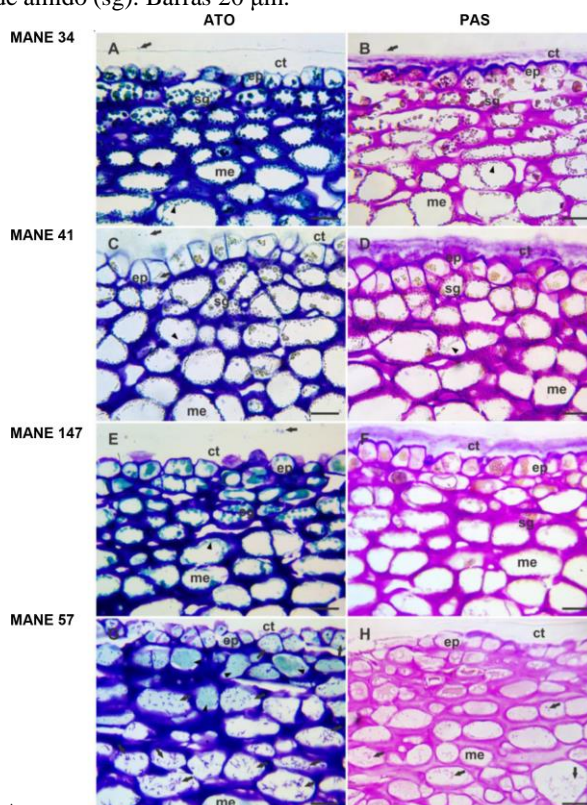
Conídios de todos os isolados de *C. fruticola* germinaram, formaram apressórios, e colonizaram células epidérmicas e do mesocarpo de frutos quando infectados no estágio L às 24 e 72 HAI (Figuras 3.11 e 3.12). Foi observada intensa acumulação de compostos fenólicos quando células foram colonizadas pelos isolados 41 e 57 às 72 HAI (Figura 3.12C, D, G e H).

Figura 3.6. Micrografias de luz de seções transversais de epicarpo de frutos de maçã no estágio J1 (fruto verde), às 24 horas após a inoculação com isolados de *Colletotrichum fructicola*. Conídios dos isolados MANE 34 (A, B), 41 (C, D) e MANE 147 (E, F) germinaram e formaram apressórios na cutícula dos frutos. Conídios do isolado MANE 57 (G, H) germinaram, formaram apressórios e hifas do fungo colonizaram massivamente (setas) as células epidérmicas e do mesocarpo. Secções coradas com azul de toluidina (ATO) (A, C, E, G) mostram reação metacromática de parede celular das células e hifas do fungo com coloração roxa, algumas das células reagiram à infecção fúngica pela acumulação de compostos fenólicos (cabeça de seta). Secções coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) (B, D, F, H) apresentam reação positiva para amido e parede celular. Apressório (ap), células epidérmicas (ep), conídio (cn), cutícula (ct), grãos de amido (sg). Barras 20 µm. Barra G. 10 µm.



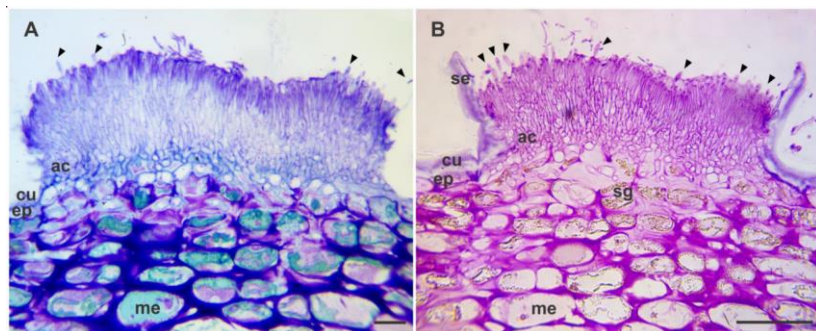
Fonte: Autor

Figura 3.7. Micrografias de luz de seções transversais de epicarpo de frutos de maçã no estágio J1 (fruto verde), às 72 horas após a inoculação com isolados de *Colletotrichum fructicola*. Conídios dos isolados MANE 34 (A, B), 41 (C, D) e MANE 147 (E, F) germinaram e formaram apressórios na cutícula dos frutos. Nas células epidérmicas dos frutos inoculados com o isolado MANE 41 (C, D) foi observado algumas divisões celulares (diamante negro). Conídios do isolado MANE 57 (G, H) germinaram, formaram apressórios e colonizaram massivamente com hifas do fungo (seta) as células epidérmicas e do mesocarpo. Algumas células epidérmicas e do mesocarpo apresentaram descolamento da membrana (H) indicando uma possível morte celular (asteriscos). Secções coradas com azul de de toluidina (ATO) (A, C, E, G) mostram reação metacromática de parede celular das células e hifas do fungo com coloração roxa, algumas das células reagiram à infecção fúngica pela acumulação de compostos fenólicos (cabeça de seta). Secções coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) (B, D, F, H) apresentam reação positiva para amido e parede celular. Apressório (ap), células epidérmicas (ep), conídio (cn), cutícula (ct), grãos de amido (sg). Barras 20 µm.



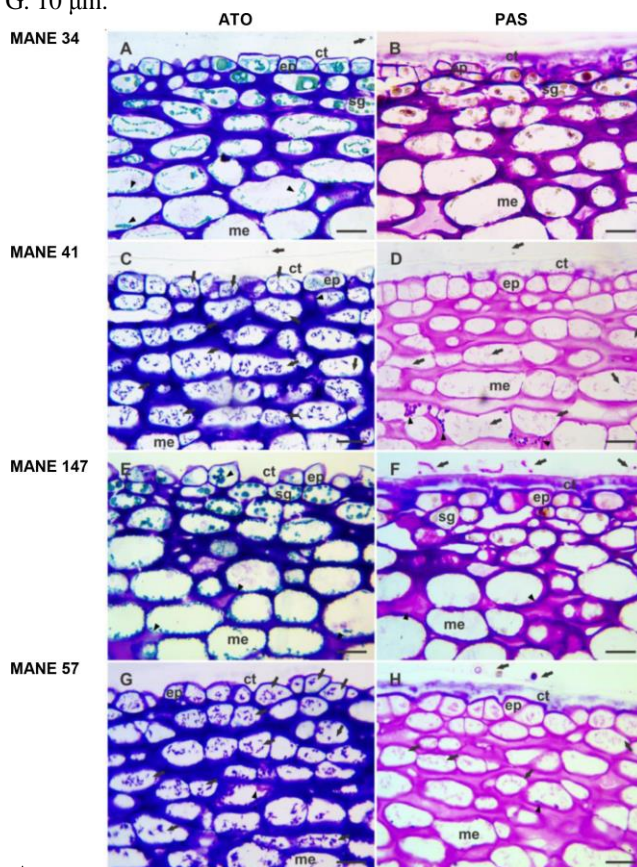
Fonte: Autor

Figura 3.8. Micrografias de luz de seções transversais de epicarpo de frutos de maçã no estágio J1 (fruto verde) 15 dias após inoculação com o isolado MANE 57. Imagens de acérvulo de *Colletotrichum fructicola* com grande produção de conídios (cabeça de seta). Cutícula (ct), células epidérmicas (ep), mesocarpo (me), grãos de amido (sg)



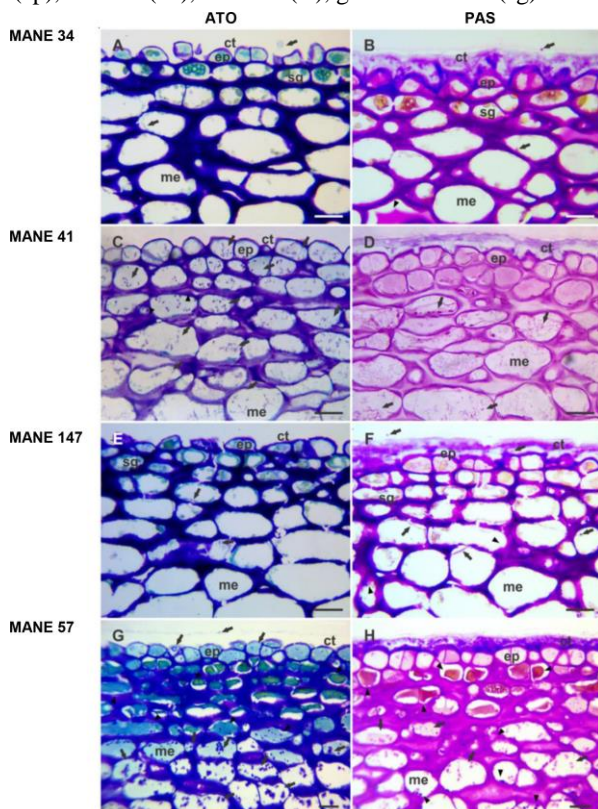
Fonte: Autor

Figura 3.9. Micrografias de luz de seções transversais de epicarpo de frutos de maçã no estágio J2 (fruto intermediário), às 24 horas após de inoculação com isolados de *Colletotrichum fructicola*. Conídios dos isolados MANE 34 (A, B) e MANE 147 (E, F) germinaram e formaram apressórios na cutícula dos frutos. Conídios dos isolados MANE 41 (C, D) e MANE 57 (G, H) germinaram, formaram apressórios e hifas do fungo colonizaram massivamente (seta) as células epidérmicas e do mesocarpo. Secções coradas com azul de toluidina (ATO) (A, C, E, G) mostram reação metacromática de parede celular das células e hifas do fungo com coloração roxa, algumas das células reagiram à infecção fúngica pela acumulação de compostos fenólicos (cabeça de seta). Secções coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) (B, D, F, H) apresentam reação positiva para amido e parede celular. Apressório (ap), células epidérmicas (ep), conídio (cn), cutícula (ct), grãos de amido (sg). Barras 20 μ m. Barra G. 10 μ m.



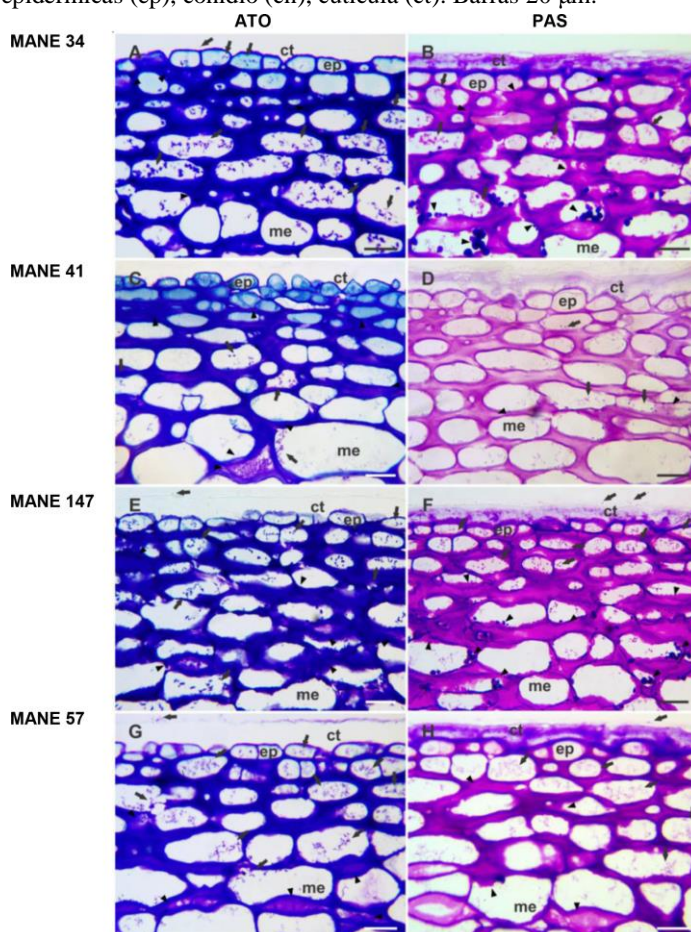
Fonte: Autor

Figura 3.10. Micrografias de luz de seções transversais de epicarpo de frutos de maçã no estágio J2 (fruto intermediário), às 72 horas após da inoculação com isolados de *Colletotrichum fructicola*. Conídios dos isolados MANE 34 (A, B), e MANE 147 (E, F) germinaram e formaram apressórios na cutícula dos frutos, embora raramente foi observado hifas do fungo colonizando as células epidérmicas e do mesocarpo. Em contraste, conídios dos isolados MANE 41 (C, D) e MANE 57 (G, H), germinaram, formaram apressórios e abundantes hifas do fungo (seta) colonizando células epidérmicas e do mesocarpo. Secções coradas com azul de toluidina (ATO) (A, C, E, G) mostram reação metacromática de parede celular das células e hifas do fungo com coloração roxa. Muitas células reagiram à infecção fúngica pela acumulação de compostos fenólicos (cabeça de seta) e algumas destas células apresentaram descolamento da membrana indicando uma possível morte celular (diamante negro). Secções coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) (B, D, F, H) apresentam reação positiva para amido e parede celular. Apressório (ap), células epidérmicas (ep), conídio (cn), cutícula (ct), grãos de amido (sg). Barras 20 µm.



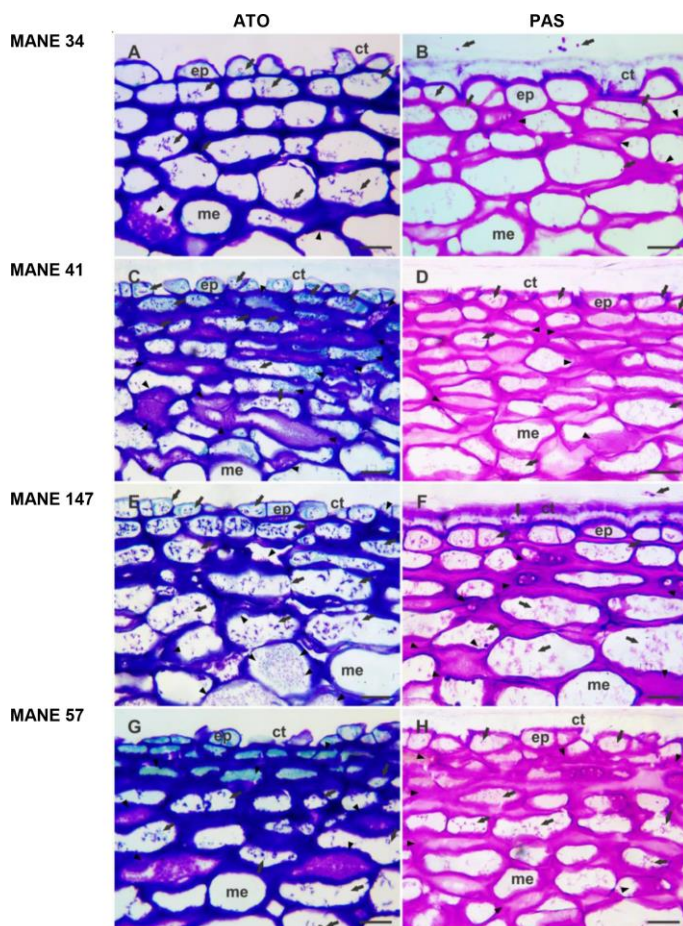
Fonte: Autor

Figura 3.11. Micrografias de luz de seções transversais de epicarpo de frutos de maçã no estágio L (fruto maduro), às 24 horas após de inoculação com isolados de *Colletotrichum fructicola*. Conídios dos isolado MANE 34 (A, B), MANE 41 (C, D), MANE 147 (E, F) e MANE 57 (G, H) germinaram, formaram apressórios e colonizaram com hifas do fungo (seta) as células epidérmicas e do mesocarpo. Secções coradas com azul de toluidina (ATO) (A, C, E, G) mostram reação metacromática de parede celular das células e hifas do fungo com coloração roxa, algumas das células reagiram à infecção fúngica pela acumulação de compostos fenólicos (cabeça de seta) nas células da epiderme e mesocarpo. Secções coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) (B, D, F, H) apresentam reação positiva para amido e parede celular. Apressório (ap), células epidérmicas (ep), conídio (cn), cutícula (ct). Barras 20 µm.



Fonte: Autor

Figura 3.12. Micrografias de luz de seções transversais de epicarpo de frutos de maçã no estágio L (fruto maduro), após 72 horas de inoculação com isolados de *Colletotrichum fructicola*. Conídios dos isolados MANE 34 (A, B), MANE 41 (C e D), MANE 147 (E, F) e MANE 57 (G, H) germinaram e formaram apressórios na cutícula dos frutos e em seguida colonizaram abundantemente com hifas do fungo (seta) as células epidérmicas e do mesocarpo. Secções coradas com azul de toluidina (ATO) (A, C, E, G) mostram reação metacromática de parede celular das células e hifas do fungo com coloração roxa, muitas células reagiram à infecção fúngica pela acumulação de compostos fenólicos (cabeça de seta). Secções coradas com ácido periódico de Schiff (PAS) (B, D, F, H) apresentam reação positiva para amido e parede celular. Apressório (ap), células epidérmicas (ep), conídio (cn), cutícula (ct). Barras 20 μm .

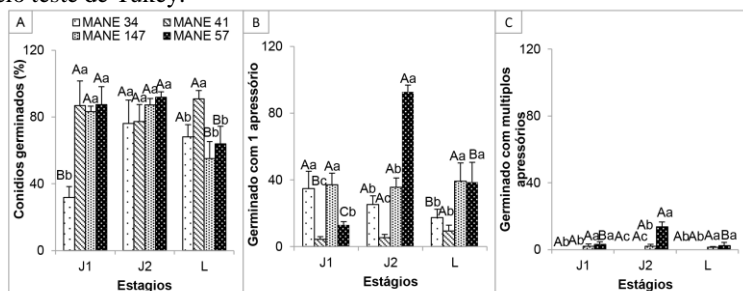


Fonte: Autor

Germinação de conídios e formação de apressórios

Os fatores estágios de desenvolvimento dos frutos e inoculação com diferentes isolados afetaram a porcentagem de conídios germinados com um apressório e germinados com múltiplos apressórios (Figura 3.13). Conídios do isolado MANE 34 quando inoculados em frutos do estágio J1 apresentaram menor porcentagem de germinação quando comparados aos outros isolados (Figura 3.13A). Conídios do isolado MANE 41 quando inoculados em frutos do estágio L apresentaram a maior porcentagem de germinação quando comparado a outros isolados (Figura 3.13A). Todos os isolados formaram apressórios, sendo o isolado MANE 41 o que apresentou o menor número de apressórios nos três estágios de desenvolvimento comparados aos outros isolados (Figura 3.13B, 3.13C). O isolado MANE 57 foi o que apresentou a maior porcentagem de conídios com um apressório no estágio J2 quando comparado aos outros isolados (Figura 3.13B). Os isolados MANE 34 e 41 não apresentaram formação de apressórios múltiplos em conídios germinados em frutos dos três estágios de desenvolvimento (Figura 3.13C). O isolado MANE 57 apresentou a maior porcentagem de conídios germinados com múltiplos apressórios em frutos do estágio J2 quando comparado ao isolado MANE 147. O isolado MANE 147 apresentou formação de múltiplos apressórios em todos os estágios de desenvolvimento do fruto (Figura 3.13C).

Figura 3.13. Porcentagem de conídios germinados (A), germinados com 1 apressório (B) e germinados com múltiplos apressórios (C) de isolados de *Colletotrichum fructicola* em frutos de maçã da cultivar Gala em diferentes estágios de desenvolvimento. Letras maiúsculas iguais nos estágios fenológicos para um mesmo isolado e minúsculas iguais para isolados dentro de um mesmo estágio não apresentam diferença significativa ($p \leq 0,05$) conforme determinado pelo teste de Tukey.



Fonte: Autor.

5.5 MODELO DA INTERAÇÃO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum fructicola* COM FRUTOS DE MAÇÃ DE DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO

Isolados de *Colletotrichum fructicola* provenientes de frutos com PA (MANE 34 e 41) quando inoculados nos três estágios de desenvolvimento germinam formando um apressório. Em frutos verdes ficam restritos à cutícula em estado de quiescência ou, se presente um ferimento compostos fenólicos inibem o crescimento do fungo (Figura 14A). Quando inoculados em frutos intermediários ou maduros sem ferimentos, eles colonizam os tecidos internos do fruto à espera da diminuição dos mecanismos de defesa dos frutos e, quando existe a presença de ferimento, eles provocam PA (Figura 3.14B).

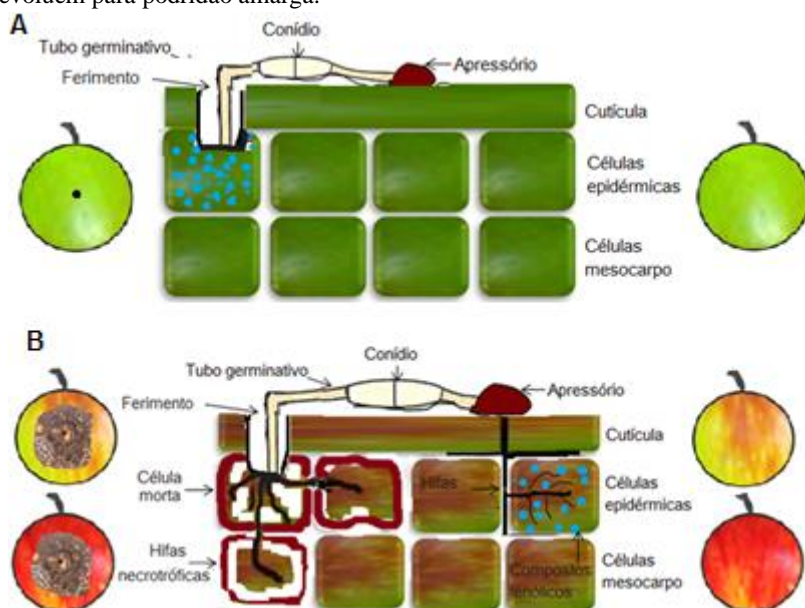
Isolados provenientes de folhas com MFG (MANE 147 e 57) durante todos os estágios, germinam formando o tubo germinativo e dois apressórios sesséis em cada extremo do conídio. Quando inoculados em frutos de maçã dos três estágios de desenvolvimento, eles apresentam diferentes respostas.

Quando o isolado MANE 147 é inoculado em frutos verdes sem ferimentos, ocasiona pequenas lesões marrons e, na presença de ferimento, não são observadas lesões de PA nos frutos (Figura 15A). Durante o estágio de fruto verde, a alta concentração de compostos fenólicos e o aumento na atividade da enzima peroxidases podem não permitir o desenvolvimento do fungo para conseguir colonizar as células do mesocarpo ficando restrito o crescimento na superfície da cutícula (figura 3.15A). Frutos intermediários, igualmente aos verdes sem ferimento quando inoculados com o isolado MANE 147, apresentam pequenas lesões marrons (figura 3.15B). No entanto, em frutos com ferimento apresenta-se uma pequena lesão no fruto, mas essa lesão não evolui para PA após 14 DAI (figura 3.15B). Durante este estágio de desenvolvimento a presença de compostos fenólicos no interior da célula restringe o desenvolvimento do fungo com pouca presença de hifas nas células do mesocarpo (Figura 3.15B). Frutos maduros sem ferimento quando inoculados com o isolado MANE 147 apresentam-se diferentes dos demais estágios, pois não apresenta nenhum sintoma no fruto e quando ferido apresenta apenas uma lesão restrita em presença de ferimento (3.15 A, B, C). Durante o estágio de fruto maduro o fungo

consegue colonizar as células, mas ele ainda não consegue ocasionar PA nos frutos.

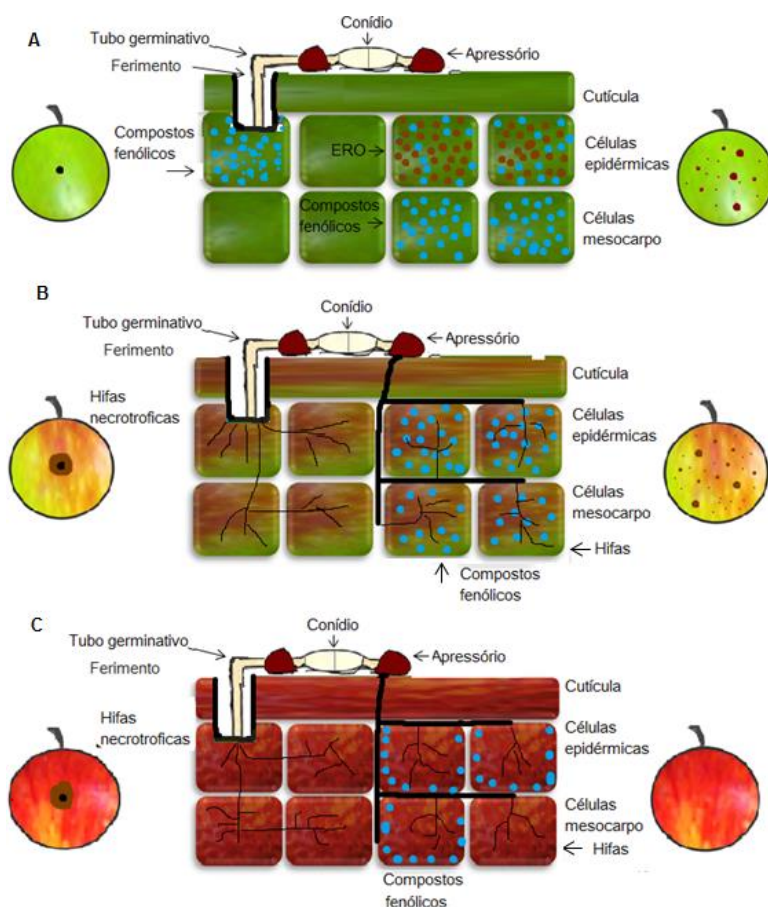
Frutos inoculados com o isolado MANE 57 apresentam PA em qualquer estágio de desenvolvimento na presença ou ausência de ferimento (Figura 3.16). Em frutos verdes são observadas inicialmente pequenas lesões marrons que evoluem para PA, pois o fungo consegue colonizar rapidamente as células do mesocarpo nas primeiras 24 HAI mesmo na presença de altas concentrações de compostos fenólicos e uma alta atividade de enzimas como a peroxidases (Figura 3.16).

Figura 3.14. Esquema do processo infeccioso de isolados de *Colletotrichum fructicola* provenientes de frutos com PA (isolados MANE 34 e 41) quando inoculados em frutos verdes, intermediários e maduros de maçã. Em frutos verdes (A) o conídio germina forma o apressório e fica quiescente em frutos com presença ou ausência de ferimentos pelo alto acúmulo de compostos fenólicos. Em frutos intermediários ou maduros para o isolado MANE 41 (B) o conídio germina, forma o apressório e fica quiescente quando não existe ferimento, mas quando existe a presença de um ferimento lesões nos frutos evoluem para podridão amarga.



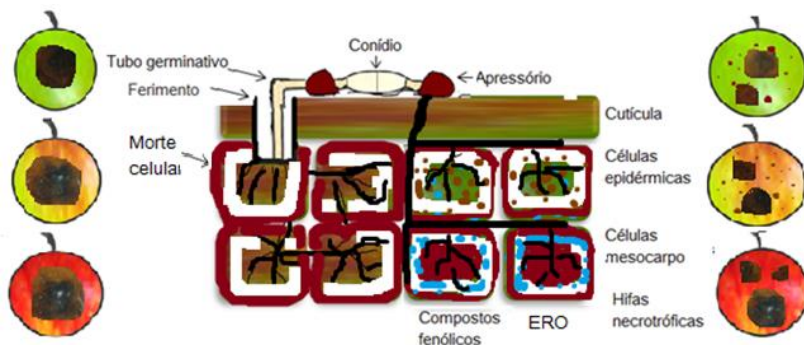
Fonte: Autor.

Figura 3.15. Esquema do processo infeccioso do isolado MANE 147 de *Colletotrichum fructicola* provenientes de folhas com MFG em frutos de maçã verdes, intermediários e maduros. Durante os três estágios o conídio germina e forma dois apressórios. Em frutos verdes (A) o fungo fica quiescente na presença de ferimento pelo alto acúmulo de compostos fenólicos; frutos sem ferimentos apresentam pequenas lesões marrons. Em frutos intermediários hifas do fungo são observadas nas células do mesocarpo e nos frutos são observadas pequenas lesões marrons em presença ou ausência de ferimento. Em frutos maduros, com ferimento a lesão é pequena e restrita; em ausência de ferimentos a infecção fica quiescente nas células do mesocarpo e não são observadas lesões nos frutos.



Fonte: Autor.

Figura 3.16. Esquema do processo infeccioso do isolado MANE 57 de *Colletotrichum fructicola* provenientes de folhas com MFG em frutos de maçã verdes, intermediários e maduros. Durante os três estágios o conídio germina e forma dois apressórios e coloniza massivamente as células epidérmicas e do mesocarpo. Em frutos verdes e intermediários são observadas pequenas lesões marrons que evoluem para podridão amarga (PA) nos frutos mesmo na presença de altas concentrações de compostos fenólicos. Em frutos maduros são observadas lesões de PA. Frutos nos três estágios de desenvolvimento quando feridos apresentam PA.



Fonte: Autor.

5.6 DISCUSSÃO

O presente trabalho apresenta as primeiras evidências de como frutos de maçã em diferentes estágios de desenvolvimento respondem bioquímica e histologicamente à infecção de isolados de *C. fructicola* com diferentes níveis de agressividade.

Frutos com ferimentos foram afetados por todos os isolados resultando em diferentes sintomas como pequena lesão restrita ou podridão amarga (PA), principalmente quando inoculados no estágio L (fruto maduro). Resultados semelhantes foram observados em peras onde o ferimento nos frutos permitiu a quebra da resistência e potencializou a eficiência na infecção de isolados de *C. fructicola* em frutos verdes e maduros que desenvolveram PA rapidamente (JIANG et al., 2014). Isolados provenientes de frutos com PA (MANE 34 e 41) só conseguiram causar sintomas de PA em frutos feridos, apresentando

uma clara deficiência em realizar uma penetração direta no fruto. Isolados com necessidade de ferimentos são menos evoluídos comparados com os que conseguem realizar uma penetração direta (LAKSHMI et al., 2011). Esses dados confirmam os apresentados no capítulo 1, onde o isolado MANE 41 não conseguiu provocar PA em frutos inoculados a campo e ainda ligados à árvore.

Lesões de PA em frutos verdes de maçãs têm sido pouco relatadas, sendo as pequenas lesões marrons atribuídas a isolados de *Colletotrichum* que provocam MFG, mas essas lesões não evoluíram para PA (KATSURAYAMA & BONETI 2012; SANHUENZA et al., 2006; VELHO et al., 2015.). Nossos resultados apresentam as primeiras evidências de um isolado proveniente de folhas com sintomas de MFG (MANE 57) como o único a causar pequenas lesões marrons que evoluíram para PA nos frutos sem ferimento, independente do estágio de maturação. Frutos intermediários e os maduros foram os mais suscetíveis a lesões de PA, mas essas também foram observadas em frutos verdes, de forma que no presente estudo não se observou um estagio com imunidade às infecções por isolados de *C. fruticola*.

Estes resultados comprovam que frutos de maçã são suscetíveis à infecção por *C. fruticola* em qualquer estagio de desenvolvimento do fruto, o que difere ao que normalmente é relatado na literatura onde se afirma que lesões de PA ocorrem principalmente em frutos maduros (GONZALES et al., 2006). No capítulo 1, também foi observado que frutos inoculados com o isolado MANE 147 (proveniente de folhas com MFG) apresentaram pequenas lesões marrons e PA em poucos frutos quando inoculados principalmente em frutos verdes e no início da maturação. Assim, esses resultados nos apresentam uma pista clara que se isolados agressivos como o MANE 57 são levados a campo e, sob condições favoráveis, pode ocorrer PA em qualquer estágio de maturação dos frutos.

No estágio J1 (frutos verdes), os isolados MANE 34, 41 e 147 não desenvolveram PA, mesmo quando inoculados em frutos feridos. Em observações microscópicas registrou-se que eles ficaram restritos à cutícula. Sendo assim, pode-se dizer que esses isolados produziram uma infecção quiescente, já que quiescência é uma característica importante de *Colletotrichum sp.* e ocorre principalmente em frutos imaturos infectados, onde eles se desenvolveriam progressivamente e colonizariam os tecidos à medida que os frutos amadurecem (PERES et

al 2005). Essas mesmas observações foram relatadas por Prusky et al. (1992), onde frutos imaturos de abacateiro se mostraram resistentes a *C. gloeosporioides* e por TERRY et al. (2004) e WILSON et al. (1990) em frutos imaturos de morango contra *B. cinérea* e *Colletotrichum* respectivamente. Em outro patossistema, laranja-*P. digitatum*, também foi observado que frutos imaturos tiveram um desenvolvimento lento da doença comparado com os frutos próximos da colheita (VILANOVA et al., 2012, 2014). Essa resistência por parte do fruto imaturo deve-se à alta quantidade de compostos antifúngicos e barreiras físicas presentes nos tecidos. Estudos têm demonstrado que frutos de maçã apresentam uma diminuição de concentração de compostos fenólicos ao longo da maturação (VALENTINES et al., 2005).

Com relação à atividade das enzimas relacionadas à defesa vegetal, constatou-se que em frutos não inoculados ocorreu uma diminuição da atividade de peroxidases (POX) e fenilalanina amônia-liase (FAL), assim como uma redução na concentração de compostos fenólicos totais (CFT) durante a maturação dos frutos. Frutos verdes apresentaram maior atividade quando comparado a frutos maduros, corroborando o apresentado por muitos trabalhos de pós-colheita que relacionam a susceptibilidade de frutos maduros à diminuição das respostas de defesa como a síntese de espécies reativas em oxigênio (ERO) e compostos antifúngicos nos tecidos dos frutos (LATTANZIO et al., 2006; PRUSKY E LICHTER, 2008).

As respostas de defesa por parte do fruto à infecção de isolados de *C. fructicola* foram alteradas, destacando-se a atividade da POX, sendo o maior aumento observado em frutos inoculados com os isolados provenientes de MFG, principalmente com o isolado MANE 57, às 48 HAI quando comparados aos frutos não inoculados. O aumento poderia indicar que houve uma grande produção dessa enzima para tentar eliminar as ERO que teriam sido formadas durante as primeiras respostas de defesa, para impedir a colonização dos tecidos. Essa produção de POX pode ter sido tão alta que prejudicou a célula, ocasionando-lhe uma morte celular, como observado por microscopia às 72 HAI, em células epidérmicas e do mesocarpo. O aumento da atividade da POX para os isolados provenientes de MFG também pode estar relacionado à alta capacidade que eles têm para formar dois apressórios, indicando alta eficiência na infecção, e consequentemente, o fruto reagiria à infecção pela formação de ERO. Isso foi visto no trabalho de Velho et al. (2016), onde os autores observaram que isolados

provenientes de MFG, com alta capacidade em formar apressórios, promoveram o aumento na atividade de enzimas antioxidativas em folhas. A alta atividade da enzima POX para tentar eliminar as ERO que são formadas durante o processo infeccioso de *C. fructicola* indica que estes isolados poderiam ter uma fase biotrófica muito curta ou mesmo nem a apresentar. Para os isolados provenientes de frutos com PA (MANE 34 e 41), não ocorreram aumentos na atividade da POX em qualquer tempo ou estágio de desenvolvimento, o que poderia estar associado ao fato desses isolados produzirem poucos apressórios em frutos intactos ou simplesmente indicar que a POX não se constitua uma resposta de defesa do fruto à infecção. Outros estudos tem associado o aumento nas enzimas antioxidativas como resposta de defesa à amônia secretada por espécies de *Colletotrichum*, resultando em explosão oxidativa, levando à indução de resistência, morte de células hospedeiras e colonização necrotrófica (ALKAN et al., 2015).

De maneira geral, a concentração de compostos fenólicos totais (CFT) também foi alterada pela infecção de isolados de *C. fructicola*. Em frutos maduros, os isolados promoveram aumento na concentração de CFT quando comparados aos frutos não inoculados. Isso pode estar relacionado ao fato desse estágio apresentar as menores concentrações quando comparado aos demais estágios de desenvolvimento. Aumento na concentração de CFT como resposta à infecção foi bem marcada para o isolado MANE 41 durante as primeiras 24 HAI nos três estágios de maturação, principalmente em frutos verdes. O isolado MANE 41, por ser proveniente de frutos com PA, pode apresentar-se mais suscetível às respostas de defesa como o aumento da concentração de CFT, não provocando lesões em frutos sem ferimentos. Por outro lado, durante o estágio J1 foram observadas poucas alterações na concentração de CFT em relação à infecção dos isolados. Essa falta de resposta pode estar diretamente ligada ao fato de que frutos verdes já apresentam uma grande quantidade de CFT.

No presente trabalho, também foi possível observar que 4 DAI com isolados provenientes de folhas com MFG (MANE 147 e 57) em frutos feridos, a alta concentração dos compostos fenólicos formou um halo clorótico ao redor da lesão. No caso do isolado MANE 147, a presença do halo inibiu o crescimento do fungo, sugerindo uma frágil relação biotrófica ou entrada em quiescência (SKIPP et al., 1995; AUYONG et al., 2012). Contudo, para o isolado MANE 57, a formação do halo clorótico ao redor da lesão, indicativa do acúmulo de compostos

fenólicos, não restringiu seu desenvolvimento porque o isolado já tinha começado a necrose ao redor da lesão concluindo em uma PA aos 14 DAI. Foi observado microscopicamente que células epidérmicas reagiram à invasão do patógeno pelo acúmulo de compostos fenólicos às 24 HAI, mas o isolado MANE 57 colonizou as células epidérmicas, do mesocarpo e ocasionou um descolamento da membrana das células, resultando em uma possível morte celular (72 HAI), o que facilitaria a fase necrotrófica do patógeno. Compostos fenólicos têm sido relatados por serem a primeira linha de defesa que limita a viabilidade dos patógenos (LATTANZIO et al., 2006). Neste trabalho não foram identificados os compostos fenólicos presentes, mas de acordo com outros estudos, os predominantes em maçãs são o ácido clorogênico e a epicatequina (MURATA et al., 1995; HOLDERBAUM et al., 2010).

Nas análises microscópicas, foi observado que o isolado MANE 57 conseguiu colonizar os tecidos do mesocarpo já nas primeiras 24 HAI em frutos dos três estágios, mostrando-se altamente agressivo. O isolado MANE 57 consegue colonizar rapidamente os tecidos mesmo que o fruto ative seus mecanismos de defesa como aumento na atividade das POX ou nas concentrações de CFT.

Frutos maduros (estágio L) foram os mais suscetíveis à infecção pelos isolados, considerando desde as observações microscópicas todos os isolados conseguiram penetrar as células epidérmicas e do mesocarpo nesse estágio. Com isso pode se pensar que mesmo que isolados como o MANE 34, 41 e 147 encontrem-se dentro do tecido do hospedeiro, eles são deficientes na síntese de enzimas degradadoras de parede celular, pois estes não provocaram PA. Provavelmente, encontrem-se numa fase quiescente, permanecendo assim até que ocorram as condições ideais para iniciar a sua fase necrotrófica e ocasionar PA no fruto. Peres et al. (2002) relataram que *C. acutatum* nem sempre tem sido associado a doenças e que esta espécie pode colonizar superfície de vegetais e permanecer como epifíticas ou endofíticas. De modo similar, isolados de *C. truncatum* permaneceram por um curto período de forma endofítica no tecido saudável e cresceram dentro do tecido sem ocasionar lesões em frutos de pimenta (AUYONG et al., 2012). Segundo Horowitz et al. (2002), para que *Colletotrichum* permaneça dentro do tecido, deve ocorrer mutações nos componentes de tradução de sinais de patogenicidade como os MAPK e os cAMP que são moléculas necessárias para a diferenciação de patogenicidade e quando

insuficientes impedem a ativação de genes correspondentes a patogenicidade.

Devido à rápida colonização do isolado MANE 57 de *C. fruticola* nos tecidos de frutos de macieira, aos sinais de morte celular às 72 HAI e aos sintomas de PA em frutos de todos os estágios de desenvolvimento, pode-se inferir que este isolado utiliza a estratégia de colonização subcuticular intramural necrotrófica, diferentemente dos isolados MANE 34, 41 e 147, que possivelmente colonizam os tecidos de forma intracelular hemibiotrófica. Embora curiosamente foi observado células do mesocarpo colonizadas pelos isolados MANE 34, 41 e 147 de *C. fruticola* em frutos de maçã de estágios intermediários e maduros. De acordo com outros estudos, hifas secundárias de *Colletotrichum* spp. são visualizadas somente no estágio necrotrófico e são restritas à cutícula ou à primeira camada de células epidérmicas sem penetrar células do mesocarpo. Desta forma, pode-se especular que no patossistema *Colletotrichum*-maçã ocorram estratégias de quiescência ou colonização diferentes das relatadas atualmente.

Pensando em termos de isolados, podemos dizer que o isolado MANE 34 apresenta-se como um isolado fraco, tendo uma infecção e colonização deficientes, não provocando qualquer tipo de lesão em frutos intactos, independente do estágio do fruto. O isolado MANE 41, também proveniente de fruto, pode ser considerado um isolado deficiente na infecção, já que precisa de ferimento para provocar lesões, mas forte na colonização, pois ocasiona PA após ter penetrado, via ferimentos, nos frutos intermediários e maduros. Quanto aos isolados de folha, MANE 147 apresenta uma alta capacidade infectiva já que forma mais de um apressório por esporo, e provoca pequenas lesões marrons em frutos verdes intactos, mas tem dificuldades na colonização dos tecidos, promovendo PA a campo somente quando estão presentes as condições ideais e atípicas (como observado no capítulo 1). Já o isolado MANE 57 combina a habilidade infectiva do isolado MANE 147 com a colonização intensa do MANE 41, resultando em um isolado muito agressivo, com um processo infeccioso muito desenvolvido, sendo pouco afetado pelos mecanismos de defesa do fruto como produção das enzimas POX ou altas concentrações de CFT.

Com os dados do presente estudo, conclui-se que os isolados de *C. fruticola* estudados são patogênicos em frutos de maçã, mas em diferentes graus de agressividade, dependendo do estágio de

desenvolvimento do fruto e da presença de ferimentos. Frutos verdes se apresentaram mais resistentes à infecção dos isolados, pela maior concentração de CFT presentes nesse estágio. No entanto, estes mecanismos de defesa não foram suficientes para evitar a colonização pelo isolado MANE 57 e ocorrência de PA nesses frutos, diferentemente do que ocorreu para os isolados MANE 34, 41 e 147, que ficaram restritos à cutícula ou sem ocasionar PA em frutos feridos. À medida que o fruto vai amadurecendo, estes tornam-se suscetíveis à infecção por todos os isolados de *C. fructicola* em frutos, desde que haja ferimentos.

Desta forma, o presente trabalho fornece uma maior compreensão dos mecanismos de defesa utilizados por frutos em diferentes estágios de desenvolvimento durante a infecção de isolados de *C. fructicola*. Com isso, os mecanismos de resistência explorados podem ser utilizados como base de conhecimento nas escolhas para o controle da doença em campo ou pós-colheita.

5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALKAN, N., & FORTES, A. M. 2015. **Insights into molecular and metabolic events associated with fruit response to post-harvest fungal pathogens.** *Frontiers in plant science*, 6.

ARAÚJO, L.; STADNIK, M. J.; BORSATO, L. C.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. 2008. **Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da Gala em macieira.** *Tropical Plant Pathology*, Viçosa, v. 33, n. 2, p. 148-152.

AUYONG A.S.M., FORD R., TAYLOR P.W.J. 2011. **Genetic transformation of Colletotrichum truncatum associated with anthracnose disease of chili by random insertional mutagenesis.** *Journal of Basic Microbiology* 52: 372-382.

BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. 1992. **Colletotrichum: Biology, pathology and control.** England: CAB Internacional Wallingford, 338 p.

BONETI J.I. DA S, KATSURAYAMA Y, BLEICHER J. 2002. **Doenças da macieira.** In: EPAGRI (Ed.) *A Cultura da Macieira*. Florianópolis, Epagri, pp. 527-593.

BRADFORD, M. M. 1976. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry, v.72, p.248-254.

FALCÓN, A.B., CABRERA, J.C., COSTALES, D.. 2008. The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica nicotianae*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.24, p.103–112.

GAHAN P.B. 1984. Plant Histochemistry and **Cytochemistry**: An Introduction.. Academic Press, London

GAUTIER M. **Les productions fruitières.** Paris, Lavoisier, 1988. 480 p.

GONZALEZ, E., SUTTON, T.B, CORREL, J.C. 2006. **Clarification of the etiology of Glomerella leaf spot and bitter rot of apple caused by Colletotrichum spp. based on morphology and genetic, molecular, and pathogenicity tests.** Phytopathology.96.982-992.

HAMADA, N. A. 2013. **Epidemiologia da mancha foliar de glomerella em macieira.** Tese (doutorado). Universidade Federal de Paraná, Curitiba-PR, p 117.

HOLDERBAUM, D.F., KON, T.B, KUDO, T.B, GUERRA, M.P. 2010. **Enzymatic browning, polyphenol oxidase activity, and polyphenols in four apple cultivars: Dynamics during fruit development** HortScience, 45, 1150-1154.

JARVIS, W. 1994. **Latent infections in the pre and postharvest environment.** Horticultural Science, 29, 749-750.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I.S.; BECKER, W.F. 2000. **Mancha foliar da gala: principal doença de verão da cultura da macieira.** Agropecuária catarinense, v. 13, p. 14-20.

KATSURAYAMA, Y & BONETI, J.I.S. 2009. **Manejo das doenças de verão da macieira no sul do Brasil** In: STADNIK MJ (Ed.) Manejo Integrado de Doenças da Macieira. Florianópolis, CCA-UFSC, p. 45-64.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I.S. 2012. **Manejo da mancha da gala**. Agropecuária catarinense, v. 25, n. 2, p. 45-51., Suplemento.

LAKSHMI, B., REDDY, P. & PRASAD, R., (2011). **Cross-infection Potential of Colletotrichum gloeosporioides Penz. Isolates Causing Anthracnose in Subtropical Fruit Crops**. Tropical Agricultural Research. 22(2), pp.183–193.

LATTANZIO V., LATTANZIO V.M.T., CARDINALI A., 2006. **Role of polyphenols in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects**. In:Imperato F., ed. Phytochemistry: advances in research. Trivandrum, Kerala, India: Research Signpost, p. 23-67.

MCCUE, P.; ZHENG , Z.; PINKHAM, J. L.; SHETTY, K. 2000. **A model for enhanced pea seedling vigour following low pH and salicylic acid treatments**. Process Biochemistry, v.35, p.603-13.

MELLERSH, D., FOULDS, I., HIGGINS, V., E HEATH, M. 2002. **H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions**. The Plant Journal, v. 29, p. 257-268.

MILES D.T., SCHILDER C.A., 2013. **Host Defenses associated with Fruit Infection by Colletotrichum Species with an Emphasis on Anthracnose of Blueberries**. Plant Management Network.

MURATA M., TSURUTANI M., TOMITA M., HOMMA S., KANEKO K. 1995. **Relationship between apple ripening and browning: changes in polyphenol content and polyphenol oxidase**. Journal Agricultural. Food Chemistry, 43, 1115–1121.

O'BRIEN, J.; DAUDI, A.; BUTT V.S.; BOLWELL G.P. 2012. **Reactive oxygen species and their role in plant defense and cell wall metabolism**. Planta, v.236, p. 765–779.

PERES, N.A.; TIMMER, W.; ADASKAVEG, J.E.; CORRELL, J.C. 2005. **Lifestyles of Colletotrichum acutatum**. Plant Disease, v.89, n. 8, p.784-796.

PRUSKY, D., KOBILER, I., & JACOBY, B. 1988. **Involvement of epicatechin in cultivar susceptibility of avocado fruits to**

Colletotrichum gloeosporioides after harvest. Phytopathologische Zeitschrift, 123, 140–146.

PRUSKY D., PLUMBLEY, R.A. 1992. **Quiescent infections of Colletotrichum in tropical and subtropical fruits.** In: BAILEY, J.A.; Ed. Colletotrichum: biology, pathology and control. CAB Internacional Wallingford, 289-307.

PRUSKY D. 1996. **Pathogen quiescence in postharvest diseases.** Annual Review of Phytopathology. 34: 413–434.

PRUSKY, D., LICHTER, A., 2008. **Mechanisms modulating fungal attack in post-harvest pathogen interactions and their control.** Eur. J. Plant. Pathol. 121, 281–289.

SCHMIDT, E.C., SCARIOT, L.A., ROVER, T., BOUZON, Z.L. 2009. **Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of Kappaphycus alvarezii (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure.** Micron, v 40, 860-869.

SKIPP R.A., BEEVER, R.E.; SHARROCK, K.R.; RIKKERINK, E.H.A.; TEMPLETON M.D. 1995. **Colletotrichum.** In K. Kohmoto, U.S. Singh, R.P. Singh, Eds., Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Histopathological, biochemical and molecular bases. Elsevier Science Ltd., Oxford, NY pp. 119–143

STADNIK, M.J., BUCHENAUER, H. 2000. **Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to Blumeria graminis f. sp. tritici.** Physiological and Molecular Plant Pathology, 57, 25-34

STADNIK, M.J., ARAÚJO, L., VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. 2009. **Estratégias alternativas de controle da mancha foliar de glomerella e da sarna da macieira** In: STADNIK MJ (Ed.) Manejo integrado de doenças da macieira. Florianópolis, CCA-UFSC, p.105-126,

STATSOFT. 2007. **Statistica: sistema de software de análise de dados**, versão 8.0. Tulsa: Stat Soft Inc.

- SU J., TU K., CHENG L., TU S.C., WANG M., XU H.R., ZHAN G. 2011. **Wound-induced H₂O₂ and resistance to *Botrytis cinerea* decline with the ripening of apple fruit.** *Postharvest Biology and Technology*, 62, 64–70
- TERRY, L.A., JOYCE, D.C. ADIKARAM, N.K.B., KHAMBAY, B.P.S. 2004. **Preformed antifungal compounds in strawberry fruit and flowers tissues.** *Postharvest Biology and Technology*. 31, 201-212.
- TORRES, M. A., JONES, J. D. G., & DANGL, J. L. 2006. **Reactive oxygen species signaling in response to pathogens.** *Plant Physiology*, v. 141, p. 373-378.
- VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; BECKER, W.; BONETI, J. I. S.; KATSURAYAMA, Y.; CZERMAINSKI, A. B. C. **Manejo das doenças de verão na produção integrada de maçã.** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho,. 12 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 36). 2002.
- VALENTINES, M.C., VILAPLANA, R., TORRES R., USALL J., LARRIGAUDIÈRE C.. 2005. **Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance.** *Postharvest Biology Technology*, 36, 227–234.
- VAN LOON, L.C., REP, M., PIETERSE, C.M.J. 2006. **Significance of inducible defense-related proteins in infected plants.** *Annual Reviews of Phytopathology*, v. 44, p. 135-162
- VELHO A.C., ALANIZ S., CASANOVA L., MONDINO P., STADNIK M. J., 2015. **New insights into the characterization of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay.** *Fungal Biology*, 119, 4, 229-244.
- VELHO A.C., ROCKENBACH, M. F., MONDINO P., STADNIK M. J., 2016. **Modulation of oxidative responses by a virulent isolate of *Colletotrichum fructicola* in apple leaves,** *Fungal Biology*. Available online 9 July 2016.
- VILANOVA LA., TEIXIDÓ N., TORRES R., USALL J., VIÑAS I. 2012. **The infection capacity of *P. expansum* and *P. digitatum* on**

apples and histochemical analysis of host response. International Journal Food Microbiology, 157, 360–367.

VILANOVA LB., VIÑAS R., TORRES R., USALL J., BURON-MOLES G. TEIXIDÓ N. 2014. **Increasing maturity reduces wound response and lignification processes against *Penicillium expansum* (pathogen) and *Penicillium digitatum* (non-host pathogen) infection in apples.** Postharvest Biology and Technology. 88, 54-60.

WILSON, L.L., MADDEN, L.V., ELLIS, M.A. 1990. **Influence of temperatura and wetness duration on infection of immature and mature strawberry fruit by *Colletotrichum acutatum*.** Phytopathology. 80, 111-116.

6 CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo apresenta um maior conhecimento do processo infeccioso de isolados de *C. fruticola* em frutos de maçã em diferentes estágios de desenvolvimento. Com isso pode-se concluir que:

- A nível de campo frutos verdes foram mais suscetíveis a infecção por isolados de *C. fruticola* proveniente de folhas com MFG.
- Em campo, isolados provenientes de frutos com PA ficam quiescentes e isolados provenientes de folhas com MFG ocasionam pequenas lesões.
- Em pós-colheita lesões provenientes de campo evoluíram para PA, independente do isolados inoculado ou estágios de desenvolvimento dos frutos.
- Em laboratório, o estágio de desenvolvimento dos frutos parece não influenciar na resistência do fungo, pois de acordo com a severidade do fungo pode ocorrer infecção em frutos com ou sem fermento causando sintomas de PA.
- Isolados provenientes de folhas com MFG (MANE 147 e 57) são mais agressivos para frutos verdes.
- Frutos maduros apresentam maior suscetibilidade à colonização dos isolados utilizados neste estudo.
- Isolados provenientes de MFG utilizados neste estudo causam mais lesões nos frutos, sejam elas pequenas lesões ou PA.
- A ativação dos mecanismos de defesa em nível bioquímico e microscópico em frutos não foi capaz de conter a colonização do isolado MANE 57 e consequentemente PA.
- A rápida colonização dos tecidos de frutos de maçã pelo isolado MANE 57 sugere que o fungo utilize a estratégia intramural subcuticular necrotrófica.
- Sugere-se que a MFG e PA sejam nomeadas de antracnose pois é a mesma doença com diferentes sintomas que podem depender das condições climáticas e a severidade do isolado, como observado no presente trabalho.